HAL
open science

Etude pharmacologique expérimentale de l'activité antipaludique d'un composé de synthèse: le chlorure de methylthioninium

Giovanny Garavito

To cite this version:

Giovanny Garavito. Etude pharmacologique expérimentale de l'activité antipaludique d'un composé de synthèse: le chlorure de methylthioninium. Pharmacologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2007. Français. NNT : . tel-00639025

HAL Id: tel-00639025

https://theses.hal.science/tel-00639025v1

Submitted on 8 Nov 2011

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

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

Université Toulouse III - Paul Sabatier

École Doctorale BSB

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ TOULOUSE III

Spécialité – **Innovation Pharmacologique**

Présentée et soutenue par :

Giovanny GARAVITO

le 29 juin 2007

Titre :

Etude pharmacologique expérimentale de l'activité antipaludique d'un composé de synthèse: le chlorure de methylthioninium

Directeur de thèse :

Docteur Eric DEHARO

JURY :

Professeur	J. C. Gantier,	Rapporteur
Docteur	O. Bain	Rapporteur
Professeur	Y. Blache	Examinateur
Docteur	E. Deharo	Examinateur
Professeur	A. Valentin	Examinateur

AUTEUR : Giovanny GARAVITO

TITRE : Etude pharmacologique expérimentale de l'activité antipaludique d'un composé de synthèse: le chlorure de methylthioninium

DIRECTEUR DE THESE : Docteur Eric DEHARO

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : Toulouse, le 29/06/2007

RESUME

Nous nous sommes intéressés à l'activité antipaludique du bleu de méthylène (BM), qui fut la première molécule de synthèse utilisée dans le traitement des accès palustres. Nous avons montré que le BM est actif sur des souches cultivées de *Plasmodium falciparum* d'origines géographiques et de chloroquino-sensibilités différentes (CI_{50}<10nM). Il est aussi actif sur le cycle sanguin de *Plasmodium* murin (DE_{50}<15mg/Kg), mais pas sur la phase hépatique. Les stades érythrocytaires les plus sensibles sont les stades jeunes. Les associations avec les traitements classiques sont de type : antagoniste avec amodiaquine ; antagonisme-additif avec atovaquone, doxycycline, pyrimethamine ; additive-pas d'interaction avec artemether, chloroquine, mefloquine, primaquine et synergique avec la quinine. Nous avons montré par spectrométrie UV, CCM et spectrométrie de masse, qu'il n'y a pas de liaison entre le BM et l'hème. Nous avons également mis au point une nouvelle technique pour mesurer la transformation de l'hème par le glutathion et mesurer ainsi l'activité des drogues sur cette transformation.

MOTS CLES : Paludisme ; Antipaludiques ; Pharmacologie ; *Plasmodium* ; Bleu de méthylène ; Chimiosensibilité ; Interactions de drogues ; Stade sensible ; Glutathion ; Hème.

DISCIPLINE : Innovation Pharmacologique.

UMR 152 IRD-UPS
Institut de Recherche pour le Développement - Université Paul Sabatier
Faculté des Sciences Pharmaceutiques,
118, Route de Narbonne, 31062 Toulouse cedex 9
France

Remerciements

A NOTRE PRESIDENT DE THESE,

Monsieur le Professeur Yves Blache
Professeur unité de molécules d'intérêt biologique, Faculté de Pharmacie, Université de Bourgogne

Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en assurant la présidence de notre jury de thèse.
Nous vous remercions pour votre disponibilité et votre amabilité à notre égard.

A NOTRE DIRECTEUR DE THESE,

Monsieur le Docteur Eric DEHARO
Chargé de recherche UMR 152 IRD-UPS « Pharmacochimie des Substances Naturelles et Pharmacophores Redox »

Pour nous avoir guidé et conseillé dans l'élaboration de ce travail, par l'amitié et l'engagement au-delà de la simple relation académique. Veuillez trouver ici le témoignage de notre reconnaissance et de notre profond respect.
Nous tenons à vous exprimer nos plus vifs remerciements.

A NOTRE JURY DE THESE,

Madame le Docteur Odile BAIN
Directeur de recherche CNRS, USM 0307 Muséum National d'Histoire Naturelle

Monsieur le Professeur Alexis VALENTIN
Professeur responsable du service d'enseignement de Zoologie, Parasitologie et Mycologie Médicale, Faculté de Pharmacie, Université Toulouse III Paul Sabatier

&

Monsieur le Professeur Jean-Charles GANTIER
Professeur de Parasitologie-Mycologie
Faculté de Pharmacie, Université Paris XI Châtenay-Malabry

> *Nous vous remercions d'avoir accepté de juger ce travail et de siéger à ce jury de thèse.*
> *Un grand merci pour la confiance que vous nous avez manifestée et pour votre grande gentillesse.*

Lors de ce travail de thèse de doctorat, j'ai bénéficié d'une bourse attribuée par le Programme Alßan Programme de bourses d'études de haut niveau pour l'Amérique latine (bourse E04D039384CO).

A TOUS MES AMIS DE L'UMR 152 ET AU DEPARTAMENTO DE FARMACIA, UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA,
Merci pour tous les bons moments passés ensemble et pour le partage une grande amitié.

Je voudrais exprimer ici ma profonde reconnaissance: A Madame Marie-Carmen Monge et à Monsieur le Professeur Alexis Valentin pour m'avoir guidé et conseillé dans l'élaboration de ce travail; A Madame le Professeur Irène Landau et à Monsieur le Professeur Chabaud pour m'avoir accueilli au Laboratoire de Parasitologie

Comparée du Muséum Nationale d'Histoire Naturelle à Paris (MNHN); A Monsieur Philippe Esterre et Monsieur Eric Legrand pour m'avoir accueilli au Centre National de Référence de la Chimiorésistance du Paludisme aux Antilles – Guyane (CNRCP) et A Madame le Professeur Françoise Nepveu pour m'avoir accueilli à l'UMR 152 IRD-UPS « Pharmacochimie des Substances Naturelles et Pharmacophores Redox ».

Une pensée particulière pour : Andrea, Lucia, Séverine, Sothea, Stéphane et Susana, qui on toujours été là, merci pour l'aide et le réconfort que vous avez su m'apporter dans les temps difficiles. Soyez assurés de mon profond attachement.

A MA MERE,
Merci d'avoir été présente tout au long de ma vie et de m'avoir guidé depuis mon enfance. Tu as toujours été mon refuge dans les moments difficiles.
Je te dédie ce moment comme la marque de ma plus grande gratitude et de tout l'amour que je te porte.

A HELENA,
Merci d'être là au quotidien, à la fois dans tous les merveilleux moments que nous vivons ensemble mais surtout dans tous ceux difficiles où tu sais m'apporter réconfort et tendresse.
Ce jour est une étape de plus dans la vie qui nous attend. Je t'aime.

SOMMAIRE

Présentation du travail 17
I. Introduction 19
1. Le paludisme 21
2. Le bleu de méthylène 26
3. L'interaction hème/glutathion 28
II. Matériel et méthodes 33
1. Matériels et Réactifs 34
1.1. Le bleu de méthylène 34
1.2. Drogues antipaludiques 34
1.3. Matériels 36
1.4. Réactifs 36
2. Matériel biologique 37
2.1. Les souches de plasmodies 37
a. *Plasmodium falciparum* 37
b. *Plasmodium* de rongeur 38
2.2. La lignée cellulaire 39
2.3. Les animaux 39
a. Comportement éthique vis-à-vis de l'expérimentation animale 39
b. Les rongeurs 39
c. Le vecteur expérimental 39
3. Culture/élevage et maintenance 40
3.1. *Plasmodium falciparum in vitro* 40
a. Entretien de la culture de *Plasmodium falciparum in vitro* 40
3.2. *Plasmodium* de rongeur 40
a. Constitution des stocks de sang parasité et conservation 40
b. Infestation et suivi de l'infection 41
3.3. Les cellules 41
a. Culture et conservation de la lignée cellulaire BJAB 41
3.4. *Anophèles stephensi* 42
a. Elevage 42
b. Production de sporozoïtes de *Plasmodium yoelii yoelii* 42
4. Techniques particulières 42
4.1. Techniques d'étude de l'activité antipaludique *in vitro* 42

a. Test de chimiosensibilité de *Plasmodium falciparum* 42
b. Détermination de la parasitémie 43
c. Détermination des Concentrations Inhibitrices 50% (CI_{50}) 43
d. Evaluation du potentiel antipaludique 44
e. Détermination du stade érythrocytaire sensible 44
f. Synchronisation de la souche 45
g. Test de stade sensible *in vitro*..... 46
h. Etude de combinaison de drogues..... 46
4.2. Techniques d'étude de l'activité antipaludique *in vivo* 48
a. Test suppressif de 4 jours ou test de Peters 48
b. Evaluation de l'activité sur stades hépatiques
(inhibition de l'invasion) 48
c. Test de l'activité sur stages hépatiques 49
4.3. Technique d'étude de la cytotoxicité 50
a. Test de cytotoxicité 50
b. Détermination des Concentrations Toxiques 50% (CT_{50}) 50
c. Détermination d'un index de sélectivité (IS) 50
4.4. Etude des mécanismes d'action..... 50
a. Modèle pharmacologique sur l'interaction hème/glutathion 50
a.1. Préparation des produits à tester 51
a.2. Étude de l'interaction hème-glutathion 51
a.3. Essai de fixation à l'hémozoïne par espectrofotometrie UV VIS ... 52
a.4. Essai de fixation a l'hémozoïne par chromatographie sur couches
minces CCM 52
a.5. Essai de fixation à l'hémozoïne par spectrométrie de masses 52
III. Résultats 54
1. Évaluation *in vitro* de l'activité antipaludique sur les souches de
Plasmodium falciparum 55
1.1. Détermination des profils de chimiosensibilité des souches
F32, HB3, FcB1 et FcM29 de *P. falciparum*……55
1.2. Activité antipaludique du bleu de méthylène *in vitro*..... 55
2. Détermination *in vitro* du stade érythrocytaire de *Plasmodium*
falciparum sensible aux composés ……..56
2.1. Détermination du stade sensible au bleu de méthylène *in vitro* 56

2.2. Détermination du stade sensible à la quinine *in vitro* 56
2.3. Détermination du stade sensible à la chloroquine *in vitro* 57
2.4. Détermination du stade sensible au artéméther *in vitro* 58
3. Etude *in vitro* de combinaison entre la bleu de méthylène et divers composés antipaludiques……..……59
3.1. Combinaison entre le bleu de méthylène et l'amodiaquine 59
3.2. Combinaison entre le bleu de méthylène et l'artéméther 60
3.3. Combinaison entre le bleu de méthylène et l'atovaquone 61
3.4. Combinaison entre le bleu de méthylène et la chloroquine 61
3.5. Combinaison entre le bleu de méthylène et la doxycycline 62
3.6. Combinaison entre le bleu de méthylène et la méfloquine 62
3.7. Combinaison entre le bleu de méthylène et la primaquine 63
3.8. Combinaison entre le bleu de méthylène et la pyriméthamine 64
3.9. Combinaison entre le bleu de méthylène et la quinine 64
4. Technique d'étude de l'activité antipaludique *in vivo* 65
4.1. Test suppressif de 4 jours ou test de Peters 65
4.2. Evaluation de l'activité sur stages hépatiques (inhibition de l'invasion) 65
5. Technique d'étude de la cytotoxicité 66
5.1. Essais préliminaires 66
a. Optimisation de la concentration cellulaire pour les essais 66
b. Détermination d'un contrôle de cytotoxicité 67
5.2. Test de cytotoxicité 67
5.3. Index de sélectivité (IS) 67
6. Etude des mécanismes d'action 68
6.1. Modèle pharmacologique sur l'interaction hème/glutathion..... 68
a. Essaies préliminaires 69
a.1. Stabilité de bleu de méthylène 69
a.2. Stabilité de Glutathion réduit 69
a.3. Stabilité de l'hème..... 70
a.4. Stabilité de l'o-phthalaldehyde 70
a.5. Temps d'incubation 70
a.6. Température d'incubation 71
a.7. Effet de solvant (méthanol) 71

b. Test sur l'interaction hème/glutathion 72
b.1. Amodiaquine 72
b.2. Artemether 74
b.3. Atovaquone 75
b.4. Bleu de méthylène 77
b.5. Chloroquine 78
b.6. Doxycycline 80
b.7. Mefloquine 81
b.8. Primaquine 83
b.9. Pyrimethamine 84
b.10. Quinine 86
6.2. Les interactions physique chimiques drogue-hème 88
a. Essai de fixation à l'hémozoïne par espectrofotometrie UV VIS 88
b. Essai de fixation a hémozoïne par chromatographie sur couches minces CCM 89
c. Essai de fixation à hémozoïne par spectrométrie de masses 90
IV. Discussion et perspectives 93
Chapitre 1 – Évaluation *in vitro* de l'activité antipaludique sur les souches de *Plasmodium falciparum* 94
1. Détermination des profils de chimiosensibilité des souches F32, HB3, FcB1 et FcM29 De *P. falciparum*……....94
2. Détermination *in vitro* du stade érythrocytaire de *Plasmodium falciparum* sensible aux composés……...95
2.1. Détermination du stade sensible au bleu de méthylène *in vitro* 95
2.2. Détermination du stade sensible à la quinine *in vitro* 96
2.3. Détermination du stade sensible à la chloroquine *in vitro* 97
2.4. Détermination du stade sensible au artéméther *in vitro* 98
3. Etude *in vitro* de la combinaison entre bleu de méthylène et divers composés antipaludiques …… 98
3.1. Interactions générales 99
Chapitre 2 - Techniques d'étude de l'activité antipaludique *in vivo* 104
1. Test suppressif de 4 jours ou test de Peters 104
2. Evaluation de l'activité sur stades hépatiques (inhibition de l'invasion) . 105
Chapitre 3 - Technique d'étude de la cytotoxicité 106

1. Essais préliminaires 106
2. Test de cytotoxicité 106
Chapitre 4 - Etude des mécanismes d'action 108
1. Modèle pharmacologique sur l'interaction hème/glutathion..... 108
1.1. Essaies préliminaires 110
a. Stabilité des composés 110
a.1. Bleu de méthylène 110
a.2. Glutathion réduit..... 110
a.3, L'hème 110
a.4. L'o-phthalaldehyde..... 110
b. Temps d'incubation..... 110
c. Température d'incubation 111
d. Effet de solvant (méthanol) 112
1.2. Test sur l'interaction hème/glutathion 112
a. Amodiaquine 112
b. Artemether 113
c. Atovaquone 113
d. Bleu de méthylène 114
e. Chloroquine..... 114
f. Doxycycline..... 115
g. Mefloquine 115
h. Primaquine..... 116
i. Pyrimethamine 116
j. Quinine..... 117
1.3. Résultats généraux d'activité des drogues..... 118
1.4. Combinaisons des drogues..... 120
a. Combinaison BM+ATO 120
b. Combinaison BM+CQ 120
c. Combinaison BM+Q 121
2. Les interactions physique chimiques drogue-hème..... 121
2.1. Essai de fixation à hémozoïne par espectrofotometrie UV VIS 121
2.2. Essai de fixation à hémozoïne par chromatographie sur couches minces CCM 122
2.3. Essai de fixation à hémozoïne par spectrométrie de masses 123

V. Résumé – conclusion 124
Bibliographie..... 127
Publications 135
Annexes..... 138

Abréviations utilisées

ACT	associations thérapeutiques à base d'artémisinine
AMO	amodiaquine
ART	artemether
ATO	atovaquone
BM	bleu de méthylène
CCM	chromatographie sur couches minces
CI_{50}	concentration inhibitrice 50%
CLHP	chromatographie liquide à haute performance
CNRCP	Centre National de Référence de la Chimiorésistance du Paludisme
CPM	coups par minute
CQ	chloroquine
CT_{50}	concentration toxique 50%
DE_{50}	dose effectrice moyenne 50%
DFUNC	Département de Pharmacie, Fac. des Sciences, Université Nationale de la Colombie
DL_{50}	dose létale 50%
DMSO	diméthyl sulfoxide
DO	densité optique
DOX	doxycycline
GRP	globules rouges parasitées O+
GRS	globules rouges saines O+
IA_{CQ}	indice d'activité par rapport à la chloroquine
IPG	Institut Pasteur de la Guyane
IRD	Institut de Recherche pour le Développement
IS	indice de sélectivité
L-glut.	L-glutamine
MEF	mefloquine
MNHN	Muséum National d'Histoire Naturelle
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OPA	O-phthalaldehyde
PRI	primaquine
PYR	pyrimethamine

Q	quinine
SH	sérum humain AB décomplémenté
SSN	solution saline normale (0,9%)
SVFd	sérum de veau fœtal décomplémenté
UFR	unités de fluorescence relative

Liste des tableaux

Tableau 1 Fréquence de résistance aux antipaludiques.

Tableau 2. Les antipaludiques.

Tableau 3. Coût, convenance et applications cliniques des thérapies antipaludiques.

Tableau 4. Données sur les différents antipaludiques utilisés.

Tableau 5 Solutions des produits à tester.

Tableau 6 Caractéristiques biologiques chez la souris des *Plasmodium* murins en conditions de laboratoire.

Tableau 7 Activités antipaludiques *in vitro* de différents antipaludiques sur les souches de *P. falciparum* F32, HB3, FcB1 et FcM29.

Tableau 8 Concentrations inhibitrices 50 (CI_{50}s) obtenues pour le BM avec les souches F32, HB3, FcB1, FcM29 de *P. falciparum*.

Tableau 9 Concentrations inhibitrices partielles (FIC) de la combinaison de bleu de méthylène avec des antipaludiques classiques contre *P. falciparum* FcM29.

Tableau 10 Intervalles de confiance de 95 % pour les sommes FIC de la combinaison de bleu de méthylène avec des antipaludiques classiques contre *P. falciparum* FcM29.

Tableau 11 Sensibilité de différentes lignes cellulaires à la doxorubicine.

Tableau 12 Activité de drogues sur la dégradation de l'hème dépendante de GSH.

Tableau 13 Niveau p de signification pour l'essai d'activité de drogues sur la dégradation de l'hème dépendante de GSH.

Liste des figures

Figure 1 Représentation schématique des cycles de *Plasmodium* de mammifères.

Figure 2 Bleu de méthylène et leucométhylène bleu.

Figure 3 Digestion de l'hémoglobine et formation de hémozoïne

Figure 4 Structures moléculaires (A) Groupe hème, (B) Hématine (C) β-hématine.

Figure 5 Catabolisme de l'hème par le glutathion.

Figure 6 Le bleu de méthylène.

Figure 7 Drogues employées.

Figure 8 Représentation schématique du cycle érythrocytaire de *Plasmodium falciparum in-vitro*.

Figure 9 Représentation schématique du dessin de plaque lors d'une expérience de combinaison de deux composés.

Figure 10 Représentation graphique des isobologrammes.

Figure 11 Section du moustique pour l'extraction des grandes salivaires.

Figure 12 Pourcentage d'inhibition *in vitro* induit par le BM à 15,3, 7,6 et 3,8 nM en fonction de la période du cycle érythrocytaire de *P. falciparum*.

Figure 13 Pourcentage d'inhibition *in vitro* induit par la Q à 1163,7, 581,9 et 290,9 nM en fonction de la période du cycle érythrocytaire de *P. falciparum*.

Figure 14 Pourcentage d'inhibition *in vitro* induit par la CQ à 344,0, 172,0 et 86,0 nM en fonction de la période du cycle érythrocytaire de *P. falciparum*.

Figure 15 Pourcentage d'inhibition *in vitro* induit par l'ART à 18,1, 9,0 et 4,5 nM en fonction de la période du cycle érythrocytaire de *P. falciparum*.

Figure 16 Isobologrammes de la combinaison BM et AMO.

Figure 17 Isobologrammes de la combinaison BM et ART.

Figure 18 Isobologrammes de la combinaison BM et ATO.

Figure 19 Isobologrammes de la combinaison BM et CQ.

Figure 20 Isobologrammes de la combinaison BM et DOX.

Figure 21 Isobologrammes de la combinaison BM et MEF.
Figure 22 Isobologrammes de la combinaison BM et PRI.
Figure 23 Isobologrammes de la combinaison BM et PYR.
Figure 24 Isobologrammes de la combinaison BM et Q.
Figure 25 Détermination des doses inhibitrices 50% (DI_{50}) de CQ et BM.
Figure 26 Essai d'inhibition de l'invasion.
Figure 27 Relation de concentration cellulaire vs réponse.
Figure 28 Contrôle de cytotoxicité.
Figure 29 CT_{50} des drogues étudiées.
Figure 30 Index de sélectivité des drogues étudiées.
Figure 31 Stabilité du bleu de méthylène.
Figure 32 Stabilité du Glutathion réduit.
Figure 33 Stabilité de l'Hème.
Figure 34 Stabilité de l'O-phthalaldehyde.
Figure 35 Cinétiques de dégradation de l'hème dépendante du GSH.
Figure 36 Comparaisons de % GSH restant dans 30 min à différentes températures d'incubation.
Figure 37 Influence du méthanol sur la dégradation du GSH et Pourcentage de GSH restant en 30 min.
Figure 38 Influence de l'AMO sur la transformation du GSH.
Figure 39 Influence de l'AMO sur la dégradation du GSH en 30 min.
Figure 40 Pourcentage de GSH restant en 30 min.
Figure 41 Influence de l'ART sur la transformation du GSH.
Figure 42 Influence de l'ART sur la dégradation du GSH et Pourcentage de GSH restant en 30 min.
Figure 43 Influence de l'ATO sur la transformation du GSH.
Figure 44 Influence de l'ATO sur la dégradation du GSH et Pourcentage de GSH restant en 30 min.
Figure 45 Influence de BM sur la transformation du GSH.
Figure 46 Influence de le BM sur la dégradation du GSH et Pourcentage de GSH restant en 30 min.
Figure 47 Influence de la CQ sur la transformation du GSH.
Figure 48 Contrôle hème dans l'Influence de la CQ sur la transformation du GSH.

Figure 49 Influence de la CQ sur la dégradation du GSH et Pourcentage de GSH restant en 30 min.
Figure 50 Influence de la DOX sur la transformation du GSH.
Figure 51 Influence de la DOX sur la dégradation du GSH et Pourcentage de GSH restant en 30 min.
Figure 52 Influence de MEF sur la transformation du GSH.
Figure 53 Influence de la MEF sur la dégradation du GSH et Pourcentage de GSH restant en 30 min.
Figure 54 Influence de la PRI sur la transformation du GSH.
Figure 55 Influence de la PRI sur la dégradation du GSH et Pourcentage de GSH restant en 30 min.
Figure 56 Influence de la PYR sur la transformation du GSH.
Figure 57 Influence de la PYR sur la dégradation du GSH et Pourcentage de GSH restant en 30 min.
Figure 58 Influence de la Q sur la transformation du GSH.
Figure 59 Contrôle hème dans l'étude de l'Influence de la Q sur la transformation du GSH.
Figure 60 Influence de la Q sur la dégradation du GSH et Pourcentage de GSH restant en 30 min.
Figure 61 Absorbance des mélanges hème–BM à 400 nm.
Figure 62 Absorbance des mélanges hème–BM à 665 nm et à des différents temps d'incubation.
Figure 63 Chromatographie sur couches minces des mélanges hème–BM lu à 254 nm.
Figure 64 Chromatographie sur couches minces des mélanges hème–BM lu à 365 nm.
Figure 65 Chromatographie sur couches minces des mélanges hème–BM lu à visible.
Figure 66 Spectre de masse du mélange BM-hème (250-1000 m/z).
Figure 67 Spectre de masse du mélange BM-hème (600-1000 m/z).
Figure 68 Essais préliminaires du stade sensible de *P. falciparum* au BM.
Figure 69 Histogramme de la variable « sommes FIC » pour la CQ.

Figure 70 Intervalles de confiance à 95 % pour les sommes FIC de la combinaison du BM avec des antipaludiques classiques contre *P. falciparum* FcM29.
Figure 71 Comparaison des DI_{50} de BM dans différents essais et souches.
Figure 72 Formation de l'adduit fluorescent entre OPA et GSH.
Figure 73 Comparaisons de valeurs p obtenus pour les drogues à différentes températures d'incubation.
Figure 74 Pourcentage de GSH restant après 30 min pour chaque drogue testées.
Figure 75 Pourcentage de GSH restant après 30 min de combinaisons de drogues par rapport aux drogues seules.
Figure 76 Absorbance des mélanges hème–BM à 400 nm et à différents temps d'incubation.

PRESENTATION DU TRAVAIL

Ce travail a bénéficié de la collaboration de plusieurs instituts de recherche apportant chacun son expertise dans un domaine particulier. Ainsi, les tests *in vivo* sur *Plasmodium* de rongeur ont été effectués au Muséum National d'Histoire Naturel (MNHN), les tests *in vivo* sur culture de *Plasmodium falciparum* à l'Institut Pasteur de la Guyane (IPG) et à la plateforme de biologie cellulaire de la Faculté de Pharmacie de Toulouse où ont eu lieu également les études de mécanistiques.

Selon les recommandations de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) une partie des efforts de recherche pour la lutte contre le paludisme doit s'appuyer sur l'étude de nouveaux traitements efficaces et bon marché. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés au bleu de méthylène en raison de ses propriétés antipaludiques et de son faible coût.

Nos travaux ont permis de définir son activité antipaludique à la fois *in vivo* et *in vitro* sur l'intégralité du cycle parasitaire, d'identifier les stades sensibles, de mettre en évidence les combinaisons de drogues les plus adaptées et préciser son mode d'action.

I. INTRODUCTION

Le paludisme est une maladie parasitaire causée par un protozoaire du genre *Plasmodium* et transmise par un vecteur du genre Anophèles. Avec près de 3 milliards d'individus exposés, le paludisme constitue l'un des principaux problèmes de santé publique mondiale. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime à 500 millions le nombre de cas cliniques survenant chaque année entraînant plus d'un million de décès, dont la majorité sont enregistrés en Afrique sub-saharienne pour des enfants de moins de 5 ans. Aucune guerre dans l'histoire n'a provoqué autant de préjudices à l'humanité. La perspective d'un vaccin n'étant pas immédiate, le contrôle du paludisme se base essentiellement sur la lutte antivectorielle et les traitements médicamenteux, dont l'efficacité est mise à mal par l'apparition et l'expansion de résistances du parasite. La prévention et la guérison du paludisme sont toutefois possibles à condition d'avoir accès à des soins performants.

Le paludisme touche principalement des personnes dans les pays à faible revenu et dans les pays à revenu intermédiaire. Cette maladie a des conséquences importantes sur la vie des ménages, sur les systèmes de soins et sur la productivité, perpétuant ainsi un cercle vicieux de difficultés d'accès aux soins, de mortalité et de retard au développement.

Malgré les négociations intenses menées entre l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et les industries pharmaceutiques afin de réduire les coûts, les traitements antipaludiques recommandés comme les associations thérapeutiques à base d'artémisinine possèdent un prix supérieur à 0,2 $US (Mutabingwa, 2005). Aussi, un tiers de la population mondiale n'aurait pas accès aux traitements essentiels, cette proportion pouvant atteindre 50% dans certaines régions d'Afrique et d'Asie. Dans ce contexte, il est évident qu'un traitement nouveau ne présentera un intérêt pour les populations concernées que s'il est particulièrement bon marché ; c'est le cas du chlorure de methylthioninium communément appelé : bleu de méthylène. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à cette molécule et avons tenté de cerner son activité antipaludique et son mécanisme d'action.

1. LE PALUDISME

1.1. *Plasmodium*

L'agent pathogène du paludisme est un hématozoaire du genre *Plasmodium*, appartenant à l'embranchement des *Sporozoa* et à l'ordre des *Hæmosporidae*.

Cent vingt-trois espèces du genre *Plasmodium* ont été répertoriées. Ce sont des parasites intracellulaires obligatoires des vertébrés transmis par des moustiques femelles.

On distingue quatre espèces de *Plasmodium* spécifiquement humains :

- *Plasmodium falciparum* : c'est l'espèce la plus pathogène. Elle peut être responsable de cas mortels en se multipliant dans les micro vaisseaux vitaux comme le cerveau, les reins ou les poumons. Elle est présente dans toute la zone tropicale, mais dominante en Afrique.
- *Plasmodium malariae* : cette espèce est responsable de la fièvre quarte (fièvre survenant toutes les 72 h). Sa répartition mondiale est très inégale.
- *Plasmodium ovale* : elle ne provoque pas d'accès palustre grave mais peut entraîner des rechutes 4 à 5 ans après la primo-infection. On la trouve principalement en Afrique de l'Ouest.
- *Plasmodium vivax* : cette espèce peut entraîner des rechutes 4 à 5 ans après la primo-infection. Elle est étendue à l'ensemble de la zone tropicale, excepté l'Afrique noire. *P. vivax* est également présente dans certaines régions tempérées.

1.2. Cycle évolutif

Le cycle de *Plasmodium* est complexe et comporte deux étapes essentielles : un cycle asexué chez l'homme, et un cycle sexué chez le moustique (Figure 1).

L'anophèle femelle injecte à l'homme le parasite sous forme de "sporozoïte". Celui-ci migre rapidement, *via* la circulation sanguine, vers le foie. Il pénètre dans la cellule hépatique, où il se divise très activement pour donner naissance, en quelques jours, à des dizaines de milliers de nouveaux parasites : les "mérozoïtes". La cellule du foie éclate en libérant ces parasites dans le sang : là, ils pénètrent à l'intérieur des globules rouges et se multiplient. Lorsque ces derniers éclatent à leur tour, les

mérozoïtes libérés dans la circulation sanguine infectent de nouveaux globules rouges.

À chaque cycle de réplication des mérozoïtes, des parasites sexués mâles et femelles (gamétocytes) sont formés à l'intérieur des globules rouges. Lorsqu'un moustique pique une personne infectée, il ingère ces gamétocytes, qui se transforment en gamètes. Leur fécondation engendre un zygote, qui se différencie en oocyste dans le tube digestif du moustique. Les oocystes produisent des sporozoïtes, qui migrent vers les glandes salivaires du moustique. Un nouveau cycle peut alors commencer.

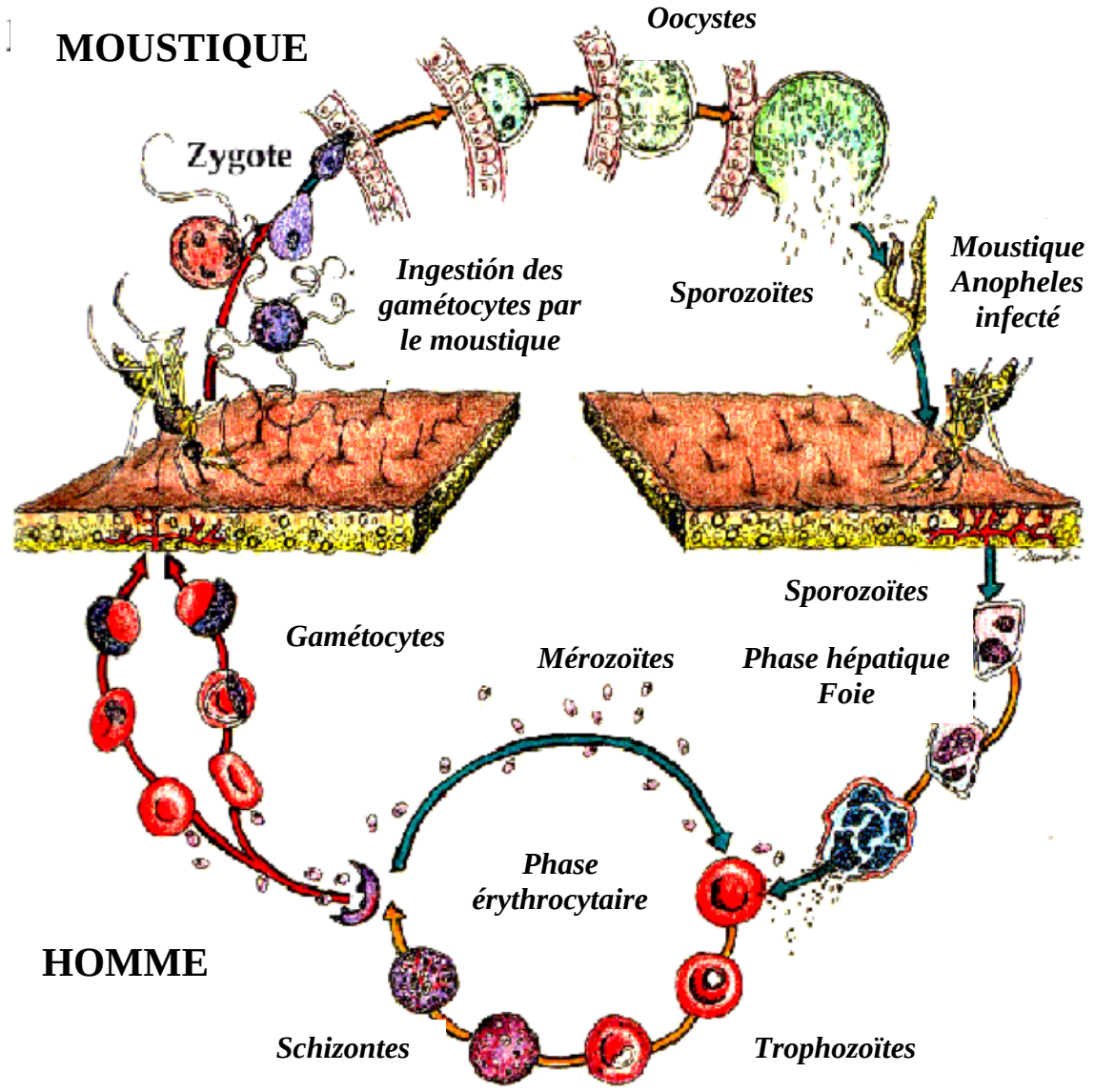


Figure 1. *Représentation schématique des cycles de Plasmodium de mammifères (adaptée de http://www.malariatest.com/cycle.html)*

Les rechutes tardives de paludisme observées lors d'infections par *P.vivax* et *P. ovale* sont dues à la possibilité pour ces espèces de subsister sous une forme latente ("hypnozoïte") dans la cellule hépatique de l'homme.

1.3. Traitements

La protection contre les piqûres de moustiques est la mesure fondamentale de prévention individuelle antipalustre, valable dans tous les cas. Elle est basée sur l'utilisation des moustiquaires imprégnées et l'usage de répulsifs cutanés.

La chimioprophylaxie n'est pas indiquée chez les résidents en zone d'endémie palustre, ni chez le sujet y effectuant des séjours itératifs rapprochés. L'arsenal thérapeutique se limite à la chloroquine, au proguanil et à la méfloquine. En raison de l'accroissement de la pharmaco résistance parasitaire et des effets secondaires propres aux différents produits, il est de plus en plus difficile d'établir des directives chimioprophylactiques rationnelles Tableau 1.

	Fréquence de résistance aux antipaludiques [a]					
Régions, Pays	**Chloroquine**	**Amodiaquine**	**Antifolates [b]**	**Quinine**	**Méfloquine**	**Artémisinine [c]**
Asie						
Inde, Pakistan	+	-	+	-	-	-
Malaisie, Indonésie	+	±	+	-	-	-
Vietnam, Cambodge	++	+	++	±	±	-
Thaïlande, Myanmar	++	+	++	+	+	-
Océan Indien						
Madagascar	±	-	+	-	±	-
Comores, Mayotte	++	±	+	-	±	-
Afrique						
Mali, Niger, Burkina	+	-	+	-	±	-
Sénégal, Gambie	++	±	+	-	±	-[d]
Côte-d'Ivoire, Nigéria	++	±	+	-	±	-
Bénin, Togo	++	±	+	-	±	-
Cameroun, Gabon	++	+	+	-	±	-
Congo, RD Congo	++	+	+	-	±	-
Kenya, Tanzanie	++	+	++	-	±	-
Amérique						
Haïti, Saint-Domingue	-	-	-	-	-	-
Amazonie	++	+	+	±	+	-[d]

[a] Chimiorésistance absente (-), rare (±), présente (+), fréquente (++ : >25%). [b] Pyriméthamine, cycloguanil, sulfadoxine-pyriméthamine. [c] Artemether et artésunate. [d] Résistance évoquée mais non confirmée.

Tableau 1. *Fréquence de résistance aux antipaludiques (Pris de Le Bras et al., 2006).*

Le traitement dépend avant tout de l'évaluation de la gravité clinique de la maladie, d'où l'importance d'un diagnostic précoce et pertinent. Il existe plusieurs molécules antipaludiques utilisées en thérapeutique, le Tableau 2 présente les différents antipaludiques commercialisés. Ils seront prescrits en fonction du diagnostic d'espèce, la résistance prédominant et l'accès au médicament (un coût ; supérieur à 0,2 $US est prohibitif pour la plupart des habitants des pays endémiques) Tableau 3. On préconise la chloroquine pour *Plasmodium vivax* et *Plasmodium malariae.*

Drogue	Famille Chimique (Poids moléculaire)	Activité sporogonique /hépatique	Erythrocyte Asexuel /Gameto	½ vie	Mécanismes d'action
Amodiaquine	4-aminoquinoléine (464,8)	Non /Non	Oui /Non	10 jours	Modification du pH de la vacuole alimentaire ; inhibition de la biocristalisation de l'hème.
Artémisinine et dérivés : Artemether, Artémisinine, Artésunate, Dihydroartémisinine, Artéether.	Sesquiterpène lactone (298,4) (282,3) (384,4) (284,3) (282,3)	Non /Non	Oui /Non (oui certains dérivés [a])	4 à 11H 2 à 5 H 2 à 3 H très courte 20 H	Stress oxydatif, action au niveau de la mitochondrie, modifie les membranes reticuloendoplasmiques, inhibition de l'ATPasa 6. [b, c, d, e]
Atovaquone	Hydroxynaphtoquinone (350)	Oui /Oui	Oui /Oui	2 à 3 jours	Inhibe l'ubiquinone mitochondriale du parasite en inhibant le transport des électrons du complexe du cytochrome bc1. [a]
Benflumétol (luméfantrine)	Fluorène (Aryl-aminoalcool) (528,9)	Non /Non	Oui /Non	3 à 6 jours	Inhibition de la biocristalisation de l'hème.
Chloroquine	4-aminoquinoléine (515,9)	Non /Non	Oui /Non [f]	10 jours	Modification du pH de la vacuole alimentaire, inhibition de la biocristalisation de l'hème.
Halofantrine	Phénantrène-methanol (Aryl-aminoalcool) (486)	Non /Non	Oui /Non	4 à 5 Jours	Inhibition de la biocristalisation de l'hème et Intervention dans l'inhibition de la pompe à proton au niveau de l'interface hôte parasite. [a]
Mefloquine	4-quinoléine-méthanol (amino alcool) (378)	Non /Non	Oui /Non	10 à 40 jours	Modification du pH de la vacuole alimentaire où se lie fortement à la ferriprotoporphyrine IX et bloquerai sa dégradation en l'hémozoïne. [a]
Primaquine	8-aminoquinoléine (455)	Non /Oui	Oui /Oui	5 à 6 H	Inhibition de la dihydroorotate réductase, métabolisme énergétique mitochondriale, interaction compétitive avec les systèmes de réduction à NADPH de l'érythrocyte et de l'hépatocyte utilisées par les schizontes pour obtenir des éléments indispensables à son métabolisme.
Proguanil	Biguanide (251,7)	Non /Non	Oui /Oui	16 H	Antifolates, inhibition de la dihydrofolate réductase (inhibition de la biosynthèse des bases puriques et pyrimidiques).
Pyrimethamine	Diamino-pyrimidine (248,7)	Non /Non	Oui /Oui	> 95 H	Antifolates, inhibition de la dihydrofolate réductase

					(inhibition de la biosynthèse des bases puriques et pyrimidiques).
Pyronaridine	Hydroxianiline-benzonaphthyridine (Base de Mannich tipe azacrine) (517,5)	Non /Non	Oui /Non	60 à 90 H	Inhibition de la DNA topoisomerase II, action au niveau de la vacuole digestive en inhibant la biocristalisation de l'hème.
Tafénoquine	Aminoquinoléine (437)	Non /Oui	Oui /Oui	14 jours	Au stade érythrocytaire inhibition de la biocristallisation de l'hème et au stade exo érythrocytaire (hépatique) et au niveau des gamétocytes par production de métabolites toxiques au niveau mitochondrial. [a]
Quinine	4-quinoléine-méthanol (amino alcool) (782,9)	Non /Non	Oui /Non [f]	10 à 12 H	Modification du pH de la vacuole alimentaire où se lie à la ferriprotoporphyrine IX et bloquerai sa dégradation en l'hémozoïne.
Antibiotiques					
Azithromycine	Macrolides (748,9)	Non /Non	Oui /Non	68 H	Inhibition de la synthèse protéique mitochondriale en se fixant de façon réversible sur la sous-unité 50S du ribosome.
Clindamycine	Lincomycines (424,9)	Non /Non	Oui /Non	3 H	Inhibition de la synthèse protéique mitochondriale en se fixant de façon réversible sur la sous-unité 50S du ribosome.
Doxycycline	Tétracycline (444,4)	Non /Non	Oui /Non	16 à 18 H	Inhibition de la synthèse protéique mitochondriale en se fixant de façon réversible sur la sous-unité 30S du ribosome.
Rifampicine	Rifamycines (822,9)	Non /Non	Oui /Non	1,5 à 5 H	Inhibe la synthèse d'ARN par action sur la sous unité béta de l'ARN polymérase ADN dépendante.
Sulfadoxine	Sulfonamides (310)	Non /Non	Oui /Non	4 à 9 jours	Inhibiteur de la synthèse de l'acide dihydrofolique

Associations [a, g, h]
Artemether – Luméfantrine ; Artésunate – Amodiaquine ; Artésunate – Méfloquine ; Artésunate – Pyronaridine ; Artésunate – Sulfadoxine – Pyriméthamine ; Atovaquone – Proguanil ; Chlorproguanil – Dapsone ; Chlorproguanil – Dapsone – Artésunate ; Méfloquine – Sulfadoxine – Pyriméthamine ; Pipéraquine – Dihidroartémisinine – Triméthoprime ; Pyriméthamine – Sulfadoxine.

[a] Pupunat, 2004 ; [b] *Ridley, 2003* ; [c] *Eckstein-Ludwig, 2003* ; [d] Benoit-Vical *et al.,* 2000 ; [e] Wen-Min *et al.*, 2003 ;
[f] Pas pour *P. falciparum* oui pour *P. vivax* et *P. malariae* ; [g] *Baird, 2005* ; [h] Lebrun-Vignes, 1999.

Tableau 2. *Les antipaludiques.*

Thérapie	Coût [a]	No. de doses	Durée de la thérapie	Applications
Chloroquine	0,11	3	48 H	Schizontocide sanguin
Sulfadoxine – Pyriméthamine	0,14	1	Une dose	Schizontocide sanguin
Quinine	0,97	21	7 jours	Schizontocide sanguin
Mefloquine	2,55	1	Une dose	Schizontocide sanguin
Atovaquone - Proguanil	48,00	3	48 H	Schizontocide sanguin
Artemether – Luméfantrine	9,12	6	48 H	Schizontocide sanguin, gamétocide
Artésunate – Méfloquine	5,00	6	48 H	Schizontocide sanguin, gamétocide
Artésunate – Sulfadoxine – Pyriméthamine	2,40	3	48 H	Schizontocide sanguin, gamétocide
Artésunate – Amodiaquine	2,00	3	48 H	Schizontocide sanguin, gamétocide
Primaquine	1,68	7 – 14	7 jours – 8 semaines	Schizontocide exo érythrocytaire (hépatique), gamétocide

[a] Le coût présenté est en dollars US de 2003 pour un adulte.

Tableau 3. *Coût, convenance et applications cliniques des thérapies antipaludiques (adapté de Baird, 2005).*

2. LE BLEU DE METHYLENE

Le chlorure de méthylthioninium plus communément appelé bleu de méthylène (BM) appartient à la famille des phénothizinium et fut synthétisé pour la première fois en 1876 par Caro (Perea-Sasiain J. 2003 ; Gensini *et al.*, 2006). Dix ans plus tard Paul Ehrlich un biochimiste allemand qui partagea le prix Nobel de physiologie en 1908 avec Elya Mechnikov, proposa le bleu de méthylène comme colorant vital des cellules ganglionnaires et des terminaisons nerveuses (Vennerstrom *et al.*, 1995). Celli et Guarnieri démontrèrent que le bleu de méthylène colorait de manière spécifique les plasmodia (Vennerstrom *et al.*, 1995 ; Gensini *et al.*, 2006). Grace à cette observation, Ehrlich et Paul Guttmann en 1891, l'administrèrent avec succès à deux patients infectés par *Plasmodium* (Guttmann et Erlich, 1891). Pour la première fois une drogue de synthèse et non d'origine naturelle était active contre le paludisme. Plus tard le BM avec la quinine, servirent de point de départ structural

pour le développement des 8-aminoquinoline (pamaquine) et 9-aminoacridine mepacrine (quinacrine) en 1925 et 1930, respectivement (Vennerstrom *et al.*, 1995).

Des travaux antérieurs ont montré que le MB devrait être reconsidéré dans le traitement du paludisme. En effet, le bleu de méthylène présente une remarquable activité antipaludique *in vitro* et *in vivo*. Il est aussi très sélectif, il n'a pas de résistance croisée avec la chloroquine. Des travaux anciens ont montré que chez des souris infectées par *P. berghei* soumises à des doses subcuratives de bleu de méthylène pendant 4 mois, le parasite développe une résistance très faible moins marquée que pour la chloroquine et réversible (Thurston, 1953).

De plus, son mécanisme d'action sur la biominéralisation de l'hème et sur la glutathion réductase est bien compris. Enfin, sa synthèse est maîtrisée, et son coût de production extrêmement faible (quelques cents le gramme) et il est encore utilisé en thérapeutique sous d'autres indications (Schirmer *et al.*, 2003).

Cependant, la limitante resterait le déficit en G6PDH, ceci s'explique sur le plan biochimique : Les stades intraérythrocytaires de *Plasmodium* présentent un intense métabolisme du glutathion. Cette enzyme joue un rôle clé dans le maintien de l'environnement réducteur du cytoplasme. Le glutathion réduit (GSH) fournit des électrons pour la synthèse des deoxyribonucléotides et participe à la détoxification de l'hème. Il est aussi connu comme coenzyme du système glyoxalase qui détoxifie le methylglyoxal, un métabolite de l'intense glycolyse de *Plasmodium*. Le BM provoque l'oxydation du glutathion par le peroxyde d'hydrogène engendré par l'autooxidation du leucoBM qui provient de la réduction du BM par le NADPH (Nicotinamide Adenine Dinucléotide Phosphate réduit). Selon certains auteurs, le MB oxyderait aussi directement le glutathion. Le NADPH, joue un rôle clé dans la réduction du glutathion oxydé (par la glutathione réductase), l'activation de la diribonucléotide réductase qui est l'enzyme limitant de la synthèse de l'ADN, pour le bon fonctionnement de la catalase et pour la synthèse des bases pyrimidiques. Le BM entre en compétition avec le glutathion oxydé pour le NADPH, bloquant ainsi la réduction du GSSG en GSH. En effet, les électrons circulent depuis le glucose-6-phosphate via l'enzyme glucose-6-phosphate déhydrogénase (G6PD) vers le NADP, puis du NADPH via une flavine réductase vers le bleu de méthylène qui se transforme en une forme réduite incolore, le leukobleu.

Ceci explique pourquoi le MB ne devrait pas être administré chez des patients déficitaires en glucose-6-phosphate déhydrogénase, cette enzyme étant la source

primordiale de NADPH dans les globules rouges. En effet, l'oxydation directe du glutathion par le bleu de méthylène associée à une diminution de la conversion du glutathion oxydé (GSSG) en glutathion réduit (GSH) peut engendrer des épisodes hémolytiques ou encore des méthémoglobinémies toxiques Figure 2.

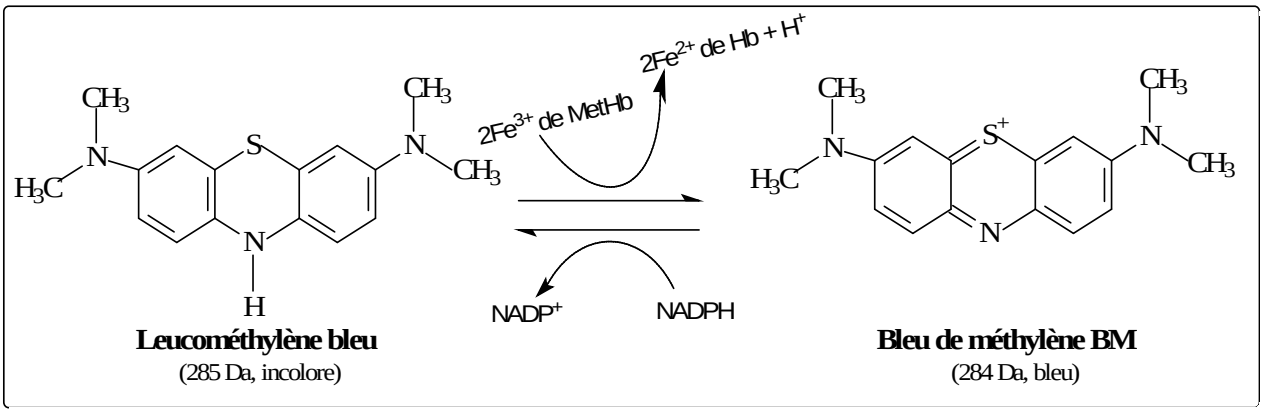


Figure 2. *Bleu de méthylène et leucométhylène bleu (adaptée de Schirmer* et al.*, 2003).*

3. L'INTERACTION HEME/GLUTATHION

La recherche de nouveaux antipaludiques repose sur l'utilisation de modèles *in vitro* (*P. falciparum*) et *in vivo* (*Plasmodium* murins). Indépendamment d'être coûteux et de soulever des problèmes moraux, ces essais prennent également du temps et les résultats sont obtenus en 3-5 jours, ce qui n'est pas approprié au criblage à haut débit. Pour détecter des activités antipaludiques, d'une manière plus économique et plus rapide, il est possible d'étudier l'impact d'une drogue sur un événement métabolique spécifique de *Plasmodium* appelé "cible", reproduit en plaques de microtitration.

La connaissance de la biochimie de *Plasmodium* a révélé beaucoup de cibles potentielles pour de nouvelles drogues; la dégradation de l'hémoglobine en fait partie. *Plasmodium* ingère l'hémoglobine par pinocytoses et la dégrade postérieurement dans sa vacuole digestive acide (pH 5,0 - 5,4), dans laquelle ont été caractérisées des protéases (plasmepsines I et II, falcipaine). La dégradation de l'hémoglobine démarre par l'action de la plasmepsine I qui coupe la liaison Phe33-Leu34. Les plasmepsines (I et II) et la falcipaine peuvent ensuite dégrader l'hémoglobine conduisant à de petits peptides (Figure 3). Hors de la vacuole, l'action

des carboxypeptidases libère des acides aminés utilisés par *Plasmodium* pour la synthèse de ses propres protéines. La conséquence de ce processus est la libération du groupement hème toxique pour le parasite (Olliaro *et al.*, 1995 ; Francis *et al.*, 1996 ; Silva *et al.*, 1996 ; Francis *et al.*, 1997 ; Ridley, 1997 ; Rosenthal, 1998 ; Garavito *et al.*, 2002).

Il a été démontré que des concentrations d'hème de l'ordre de 20 mM dégradent la membrane du parasite en 10 minutes. Cette quantité est produite par la digestion de seulement 1 % de l'hémoglobine érythrocytaire (le parasite consomme environ 75 % de l'hémoglobine présente dans le globule rouge). Le groupe prosthétique (hème) maintient le fer en son état ferreux. Une fois libéré de sa protéine, il tend à perdre un électron et assumer son état ferrique à l'origine des dommages de la membrane par sa capacité à générer des espèces réactives de l'oxygène (Figure 4). De même, il interfère avec la voie de dégradation de l'hémoglobine (la falcipaine est très sensible à la présence de l'hème). *Plasmodium* requiert donc des processus hautement efficaces pour se débarrasser de ce résidu (Atamna et Ginsburg, 1995; Ginsburg *et al.*, 1998; Garavito *et al.*, 2002).

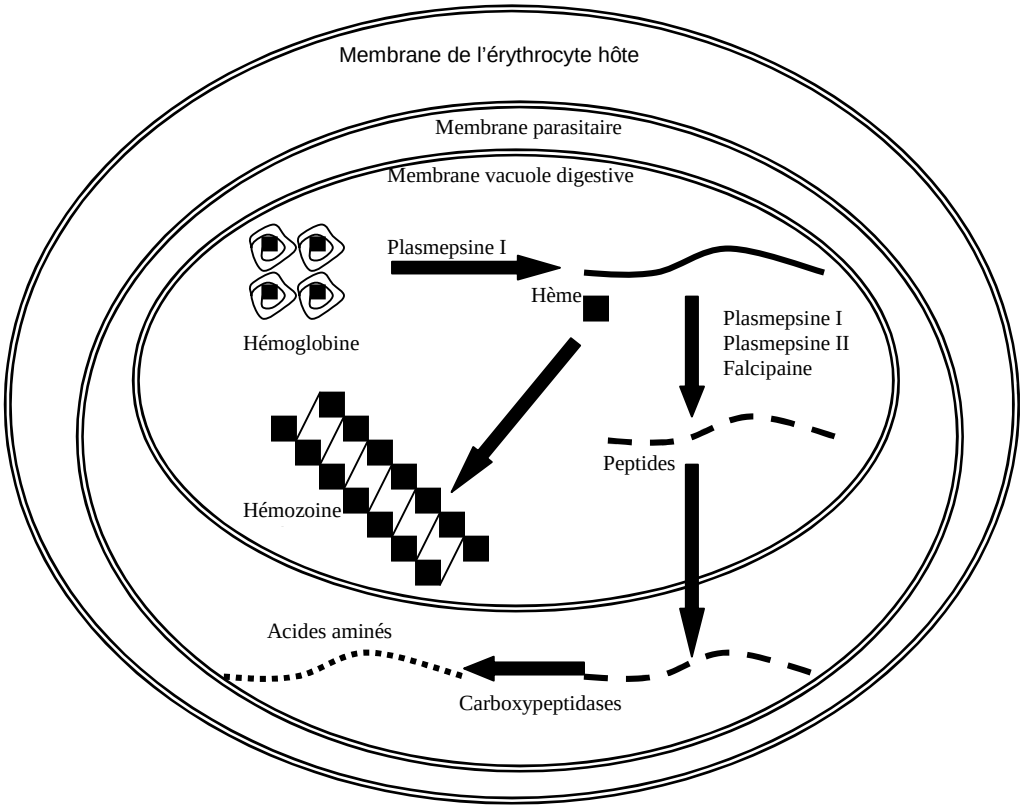


Figure 3. *Digestion de l'hémoglobine et formation de hémozoïne (adaptée de Garavito* et al.*, 2002).*

Plasmodium se protège partiellement contre la toxicité de l'hème en la biocristallisation en hémozoïne insoluble ou pigment malarique (Figure 3). Seulement 20 à 30 % de l'hème sont éliminés par cette voie (Ginsburg *et al.*, 1998). L'hémozoïne est un produit idéal pour la détoxication du groupement hème car elle est insoluble dans les conditions physiologiques et étant donné sa nature cristalline, ne contribue pas à produire des radicaux de l'oxygène, nuisibles pour le parasite. Lors de la rupture des schizontes, des quantités importantes d'hémozoïne sont libérées et ingérées par les macrophages. Ce processus diminue leur capacité de réponse face aux infections. Cette libération massive constitue en outre un élément de distraction de la réponse immune, en altérant les voies de sécrétion de cytokines (Arese *et al.*, 1997; Garavito *et al.*, 2002). Il est suggéré que l'accumulation de ce pigment dans les cellules endothéliales, à la suite d'infections palustres répétées, réduit les mécanismes locaux d'inflammation et facilite le passage à d'autres tissus, ce qui est associé aux formes sévères de la maladie.

L'hémozoïne s'accumule dans le foie et le rein où sa concentration est augmentée avec la progression de la parasitémie (Taramelli *et al.*, 1998). L'hème libre interagit de façon non spécifique avec des protéines. Au niveau membranaire elle augmente la perméabilité aux cations, induit la peroxydation des lipides. Elle provoque une perte du potassium du parasite et inhibe la glycolyse et la synthèse d'ADN. Des concentrations élevées d'hème inhibent le processus de dégradation de l'hémoglobine. Il est aussi possible que de l'hème quitte le globule rouge parasité et se lie à l'albumine sérique ou à l'hemopexine. (Atamna et Ginsburg, 1995 ; Ginsburg *et al.*, 1998).

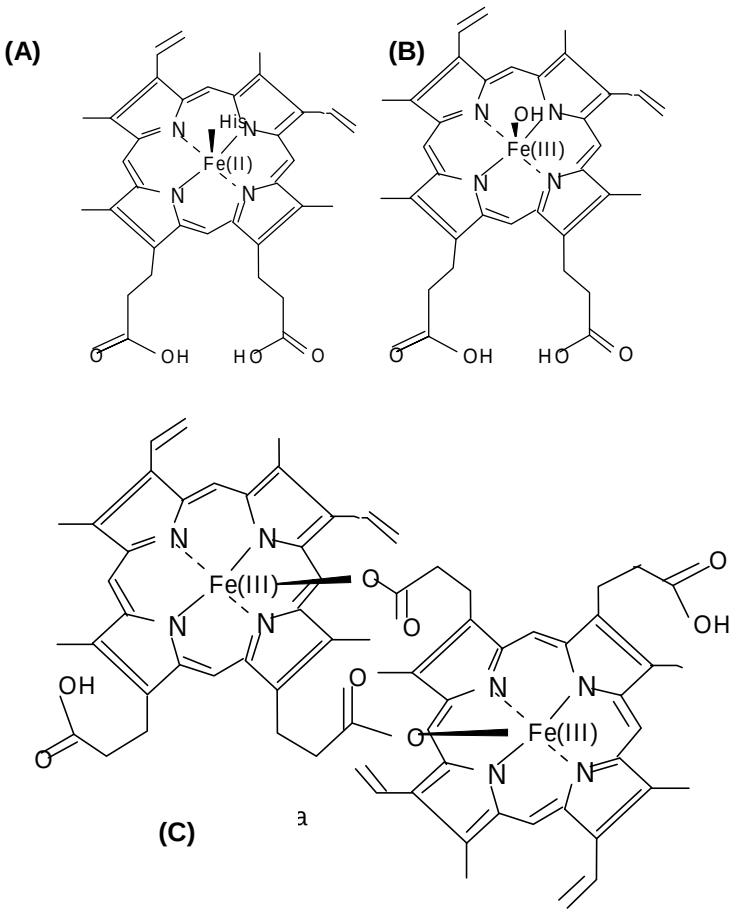


Figure 4. *Structures moléculaires (A) Groupe hème, (B) Hématine (C) β-hématine (adaptée de Garavito et al., 2002).*

L'hème échappant à la cristallisation (70 - 80 %) sort de la vacuole digestive et est catabolisée par le glutathion réduit (GSH) conduisant à la formation du glutathion oxydé (GSSG) et à la libération du groupe fer ; Figure 5 (Atamna et Ginsburg, 1995; Ginsburg *et al.*, 1998).

Atamna *et al.* (1995) ont démontré que le glutathion réduit (GSH) peut dégrader l'hème quand il est libre en solution à pH 7, quand il est uni non spécifiquement à des protéines, une fois dissout dans la membrane érythrocytaire ou chargé dans des érythrocytes intacts. Cette dégradation de l'hème par le GSH fournit le fer au parasite et est à l'origine des niveaux élevés de fer trouvés dans des cellules infectées et est en partie responsable du niveau élevé de production des espèces oxydantes réactives dans les cellules infectées (Ginsburg *et al.*, 1998).

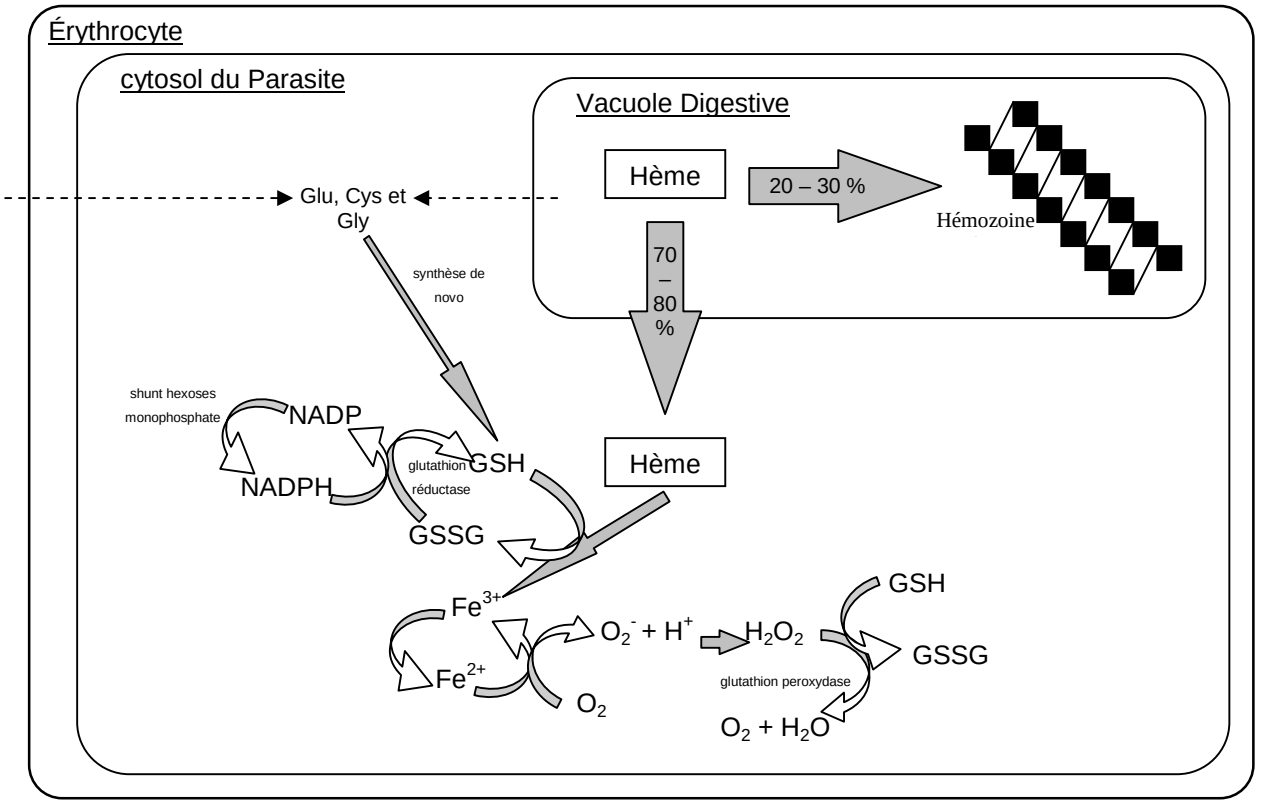


Figure 5. *Catabolisme de l'Hème par le glutathion (adapté de Ginsburg et al., 1998).*

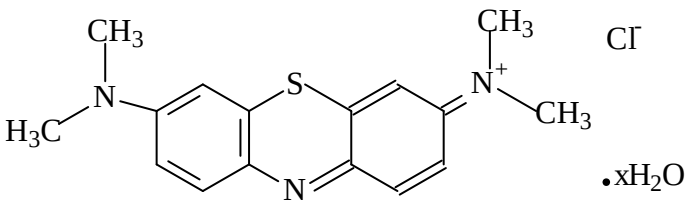
Le fer libéré à partir de l'hème dégradée peut s'engager dans le cycle redox en produisant de l'O_2^- qui par l'intermédiaire du superoxyde dismutase est converti en H_2O_2. Le GSSG est produit pendant la dégradation de l'hème et au cours de la réduction de H_2O_2 par la glutathion peroxydase. Le GSSG est réduit en GSH par la glutathion réductase, qui emploie le NADPH comme cofacteur. Le NADP résultant est réutilisé par le shunt des hexoses monophosphates; ce shunt est augmenté jusqu'à 78 fois dans le GRP par rapport au GRS (Becker *et al.*, 2003) et est inhibé par la CQ (Famin et Ginsburg, 2003). Le GSH peut aussi être synthétisé de novo à partir de la glutamine, la cystéine et la glycine ; Figure 5 (Ginsburg *et al.*, 1998). Le GSH joue un rôle important dans les défenses antioxydants du parasite (Atamna et Ginsburg, 1997).

Ainsi, une drogue capable d'empêcher l'interaction entre le GSH et l'hème est potentiellement capable de bloquer le développement de *Plasmodium*.

II. MATERIEL ET METHODES

1. MATERIELS ET REACTIFS

1.1. Le bleu de méthylène



Bleu de méthylène BM

Figure 6. *Le bleu de méthylène.*

Le bleu de méthylène 3,7-Bis(dimethylamino)phenothiazin-5-ium chloride $C_{16}H_{18}ClN_3S \bullet xH_2O$, préparé pour la première fois par Caro en 1876, est aujourd'hui synthétisé à partir de dimethylaniline et d'acide thiosulfurique. Il s'agit d'un hydrate avec un poids moléculaire de 319,85 (base anhydre). C'est une poudre cristalline inodore de couleur bleu fonçée. L'absorption maximale est autour de 668, 609 nm. Un gramme se dissout dans 25 ml d'eau, 65 ml d'alcool. Il est aussi soluble dans le chloroforme et insoluble dans l'éther.

1.2. Drogues antipaludiques

La Tableau 4 et la Figure 7 présentent les drogues employées tout au long de ce travail.

	PM (g/mole)	Fournisseur	Lot	Structure chimique
AMO	464,8	Sigma-Aldrich	38F0993	$C_{20}H_{22}O\ Cl\ N_3*2HCl*2H_2O$
ART	298,4	Cambrex	ART-AS104378	$C_{16}H_{26}O_5$
ATO	366,5	GlaxoSmithKline	566C80	$C_{22}H_{19}ClO_3$
CQ	515,9	Sigma-Aldrich	110K1278	$C_{18}H_{26}N_3Cl*2H_3PO_4$
DOX	512.9	Sigma-Aldrich	100K1340	$C_{22}H_{24}N_2O_8.HCl$
MEF	378,0	Roche	82031	$C_{17}H_{16}F_6N_2O$
BM	320,0	Fluka	1115938	$C_{16}H_{18}ClN_3S*H2O$
PRI	455,0	Sigma-Aldrich	62H0662	$C_{15}H_{21}N_3O*2H_3PO_4$
PYR	248,7	Sigma-Aldrich	17H1127	$C_{12}H_{13}\ Cl\ N_4$
Q	782,9	Sigma-Aldrich	88H0827	$(C_{20}H_{24}N_2O_2)2*H_2SO_4*2H_2O$

Tableau 4. *Données sur les différents antipaludiques utilisés. PM : poids moléculaire.*

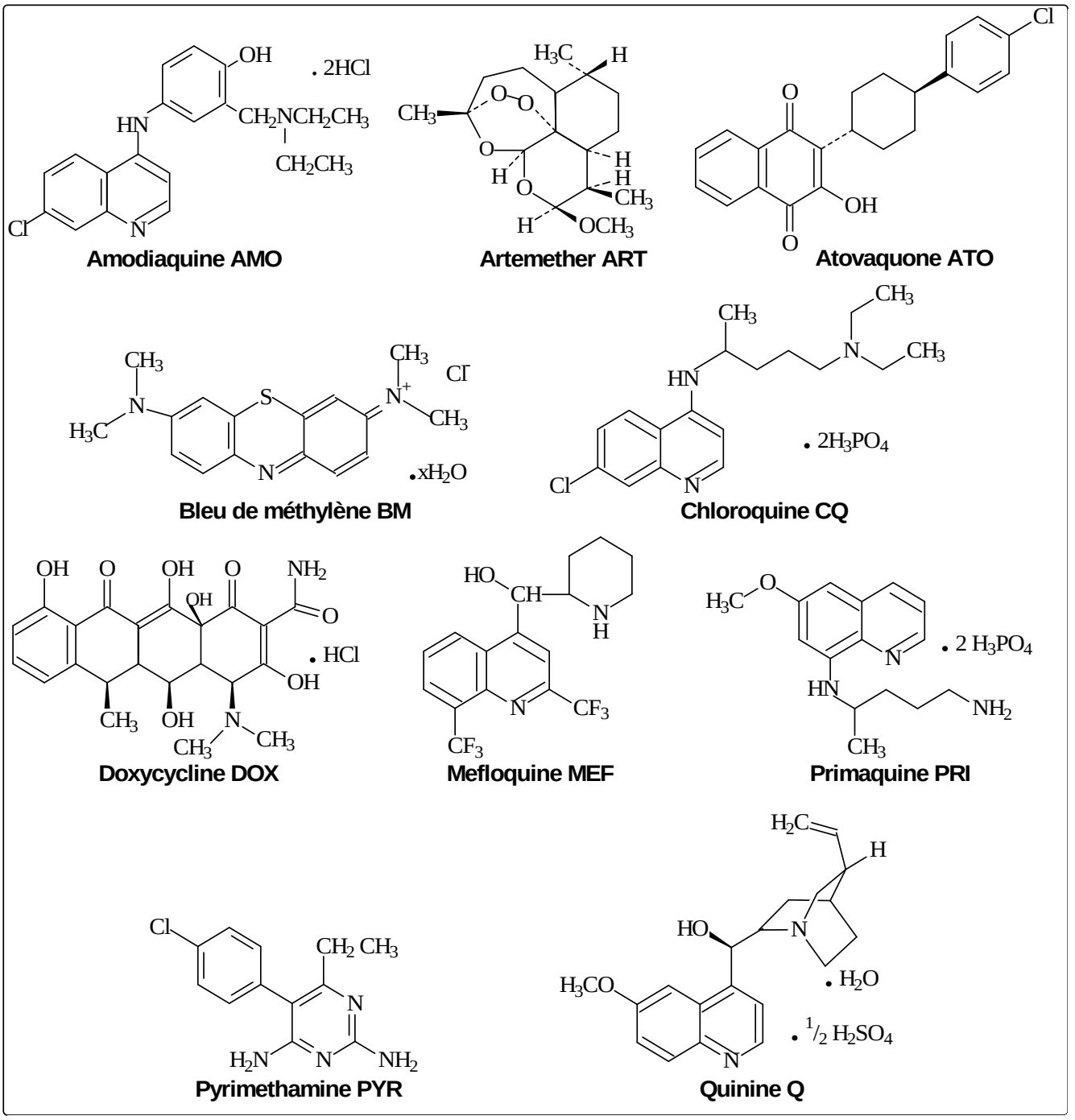


Figure 7. *Drogues employées.*

Les différents antipaludiques ont été pesés et dissouts dans des solvants appropriés, Tableau 5. Toutes les préparations ont été conservées à l'abri de la lumière, à 4°C, dans des flacons en verre stériles (Institut Pasteur CNRCP, 2003). Toutes les concentrations finales de solvant ont été inférieures à 0,05 % pour ne pas avoir d'effet sur la croissance du parasite (Ye *et al.*, 1983; Ohrt *et al.*, 2002; Fivelman *et al.*, 2004).

	Masse (mg)	Solution mère (ml)
ART	37,2	10 Méthanol
AMO	10	20 Ethanol 70
ATO	5,5	50 Méthanol
BM	100	10 Eau
CQ	5	20 Ethanol 70
DOX	2	0,8 RPMI (pas de stock)
MEF	8,2	20 Méthanol
Q	10	20 Ethanol 70
PRI	5	20 DMSO
PYR	10	20 Ethanol 70

Tableau 5. *Solutions des produits à tester.*

1.3. Matériels

- Collecteur de cellules (Cell Harvester System PerkinElmer)
- Compteur β (1450-Microbeta-TriLux, Wallac-PerkinElmer)
- Informatique (les résultats on été analysés par Excel® et Stata 7,0)
- Spectrophotomètre BGM, Polarstar a96-well plate reader (filtres: excitation 350 nm, et émission 420 nm)
- Spectromètre de masse de triple quadrupole (Perkin-Elmer Sciex Instruments)
- Spectrophotomètre UVIKON 931
- Système HPLC (Waters 600 solvent delivery system, Waters 717 plus autosampler, Waters 474 scanning fluorescence detector et Waters Millenium workstation), *Colonne pour HPLC Inertsil, ODS-2, C18 (5 µLm, 250 x 4,6 mm) (AIT, Mesnil Le Roi, France)*

1.4. Réactifs

- Acétate de sodium (Sigma-Aldrich L'Isle d'Abeau Chesnes, France)
- Acetonitrile grade HPLC (SDS Peypin, France)
- Acide acétique (Sigma-Aldrich L'Isle d'Abeau Chesnes, France)
- Ammoniaque (Sigma-Aldrich L'Isle d'Abeau Chesnes, France)
- Chloroforme (Sigma-Aldrich L'Isle d'Abeau Chesnes, France)
- Globules rouges sains O+ GRS (Etablissement Français du Sang à l'Hôpital de Rangueil, Toulouse, Voir détaille Annexe 1)
- GSH (Sigma-Aldrich L'Isle d'Abeau Chesnes, France). Solution à 0,3 mM dans

HCl à 0,1 M

- Hémine (Sigma-Aldrich L'Isle d'Abeau Chesnes, France). Solution à 0,3 mM dans NaOH à 0,2 N
- [^{3}H]-hypoxanthine (PerkinElmer, Courtaboeuf, France)
- Milieu de culture RPMI 1640 sans L-glutamine (Cambrex: Emerainville, France. Ref 12-702F) (Voir détaille au Annexe 1). Pour 500 ml de milieu, 12,5 ml de solution Tampon HEPES 1M stérile (acide-N2-hydroxyéthyl-pipérazine-N'2-éthane-sulfonique, Cambrex: Emerainville, France. Ref BE17-737E). Ce milieu est conservé au réfrigérateur à + 4°C pour entretenir les cultures quotidiennement.
- Méthanol (Sigma-Aldrich L'Isle d'Abeau Chesnes, France)
- L-glutamine L-Glut. (Cambrex: Emerainville, France. Ref BE17-605E)
- l'O-phthalaldehyde A (Sigma-Aldrich L'Isle d'Abeau Chesnes, France). Solution à 17,5 mM dans Méthanol : Na2B4O7 (1:2)
- Sérum humain AB SH (Etablissement Français du Sang à l'Hôpital de Rangueil, Toulouse, Voir détails au Annexe 1)
- Solution tampon HÉPÈS (Sigma-Aldrich L'Isle d'Abeau Chesnes, France). À pH 7 et à 0,2 M

2. MATERIEL BIOLOGIQUE

2.1. Les souches de plasmodies

a. *Plasmodium falciparum*

Quatre souches de référence de *Plasmodium falciparum* ont été utilisées :

- la souche F32 originaire de Tanzanie, sensible à la chloroquine.
- la souche HB3 originaire du Honduras, sensible à la chloroquine et à la pyriméthamine (Bhasin et Trager, 1984).
- la souche FcM29 originaire du Cameroun, résistante à la chloroquine.
- la souche FcB1 originaire de Colombie, résistante à la chloroquine (Trager et Jensen, 1976).

Ces souches nous ont été fournies par l'UMR 152 IRD-UPS « Pharmacochimie des Substances Naturelles et Pharmacophores Redox » et le Centre National de Référence de la Chimiorésistance du Paludisme aux Antilles – Guyane (CNRCP).

b. *Plasmodium* de rongeur

Les principales caractéristiques biologiques sont détaillées dans le Tableau 6.

Espèces	Sporogonie	Schizogonie hépatique	Schizogonie érythrocytaire		Gamétocytes
			Durée du cycle érythrocytaire	**Indice de sensibilité à la chloroquine**	
P. yoelii yoelii	de 9 à 15 jours à 23°C	≥ 45h	18h - asynchrone	25	production constante au cours de l'infection
P. yoelii nigeriensis	de 9 à 15 jours à 23°C	≥ 45h	18h - asynchrone	10	production constante au cours de l'infection
P. vinckei petteri	de 10 à 12 jours à 24-25°C	> 60h	24h - synchrone	1	production constante au cours de l'infection
P. berghei	de 12 à 14 jours à 24°C	≥ 50h	21h - asynchrone	5	production constante au cours de l'infection

Tableau 6. *Caractéristiques biologiques chez la souris des* Plasmodium *murins en conditions de laboratoire. (adapté de Landau et Gautret, 1998).*

- *P. yoelii yoelii* Landau & Killick-Kendrick, 1966 – Souche 17X provenant d'un Muridé africain (*Thamnomys rutilans*) capturé en 1969 à La Maboké, en République Centrafricaine et clonée (clone 1,1) en 1969.
- *P. yoelii nigeriensis* Killick-Kendrick, 1973 – La souche a été isolée à partir d'un *Thamnomys rutilans* capturé à Ilobi au Nigeria en 1973 (la souche a été fournie par R. Killick-Kendrick).
- *P. vinckei petteri* Carter et Walliker, 1977 – La souche a été isolée à partir d'un *Thamnomys rutilans* capturé en République Centrafricaine en 1977.
- *P. berghei* Vincke et Lips, 1948 – La souche NK65 (NK pour New York-Kasapa) a

été isolée à partir des *Grammomys surdaster, Leggada bella* et *Praomys jacksoni* et le vecteur *Anophèles dureni millecampsi* capturé à Shaba au sud de la République Démocratique du Congo en 1948.

2.2. La lignée cellulaire

BJAB est une lignée cellulaire humaine de lymphome type B, dérivée d'un cas africain exceptionnel de lymphome de Burkitt établie par Menezes *et al.* en 1975 (Steinitz et Klein, 1975). Cette ligne cellulaire a été fournie par l'Institut Pasteur de Guyane (V. Lacoste) où l'essai a été effectué.

2.3. Les animaux

a. Comportement éthique vis-à-vis de l'expérimentation animale

Toute expérimentation animale doit suivre la règle des 3 Rs (Réduction, Remplacement, Raffinement) énoncée par Russell et Buch (1959) et également se conformer aux principes de Marshall Hall (cités par Monamy, 2000) afin de réduire le nombre d'animaux utilisés ou de les remplacer, ou encore de réduire la douleur, le stress ou la détresse des animaux. En France, le décret 2001-464 du 29 mai 2001 et en Colombie la Résolution 008430 de 1993 du Ministère de la Santé précisent les règles relatives à l'éthique qui s'imposent à l'expérimentation animale.

b. Les rongeurs

Les animaux utilisés sont des souris albinos Swiss IOPS OF_1 femelles non-consanguines (Charles Rivers Laboratories^{TM}) pesant entre 20 et 25 grammes, et âgées de 4 à 8 semaines. Les animaux sont élevés avec boisson et nourriture *ad libitum*, en lots n'excédant pas 6 individus et en animalerie soumise à une alternance artificielle jour/nuit de 12 heures (6 h – 18 h).

c. Le vecteur expérimental

L'élevage d'*Anopheles stephensi* Liston, 1901 utilisé au MNHN provient d'un élevage initialement établi par Shute et Maryon en 1966.

3. CULTURE / ELEVAGE ET MAINTENANCE

3.1. *Plasmodium falciparum in vitro*

Trager et Jensen (1976) ont décrit un protocole pour la culture des stades érythrocytaires de *P. falciparum in vitro*. Desjardins *et al.*, (1979) ont proposé une miniaturisation et semi-automatisation permettant la culture sur des plaques de microtitration et la quantification de la croissance parasitaire par l'incorporation d'un précurseur d'acides nucléiques radio marqué. Cette technique nous a permis de déterminer l'activité antipaludique du BM et des autres drogues. Elle est aussi le point de départ des techniques de détermination du stade sensible et de combinaison de drogues.

a. Entretien de la culture de *Plasmodium falciparum in vitro*

Les souches sont maintenues en culture continue au laboratoire selon la technique de Trager et Jensen (1976). Les GRP sont cultivés dans des flacons de 25 cm^3 (Corning Costar Corporation, USA) contenant 8,5 ml de milieu RPMI 1640, 0,7 ml de SH, 0,1 ml de L-glut. et 400 µl de sang parasité (hématocrite = 4 %). La parasitémie est maintenue entre 0,7 et 3 % (autour de 2 %). Les ajustements de parasitémie sont réalisés avec des hématies saines lavées (Annexe 2).

Les cultures sont incubées dans une étuve à 37°C, avec 5% de CO_2, et une humidité autour de 90%. Le milieu est renouvelé quotidiennement et un contrôle microscopique (x 1000) de la parasitémie est effectué par la réalisation d'un frottis sanguin fixé au méthanol, coloré au Giemsa, afin de vérifier le bon état de la culture (Annexe 2).

3.2. *Plasmodium* de rongeur

a. Constitution des stocks de sang parasité et conservation

Un lot de cinq souris est infesté (par voie intra péritonéale) à partir d'un même stock de sang congelé. L'évolution de la parasitémie est contrôlée régulièrement sur frottis. Lorsque la parasitémie avoisine 20 %, les souris sont anesthésiées avec un mélange de Rompun® à 0,4% et d'Imalgène®500 à 3,5% (2,5 ml/kg par voie intrapéritonéale) et 1 ml de sang environ est prélevé à chaque souris par ponction cardiaque à l'aide d'une seringue héparinée. Le sang de toutes les souris est mélangé à la seringue dans un tube hépariné. Une solution de glycérol à 10 % (1 ml

de glycérol + 9 ml de NaCl 0,9%) est ajoutée volume à volume au sang parasité. Le sang ainsi glycérolé est réparti dans des tubes à congélation à raison de 1 ml par tube puis stocké dans un congélateur à -70°C, ou bien dans l'azote liquide à -196°C. Ce procédé permet d'effectuer plusieurs expériences à partir d'un même stock de sang congelé.

b. Infestation et suivi de l'infection

Les rongeurs sont infestés soit avec du sang parasité, soit avec des sporozoïtes. Afin d'obtenir directement une infection sanguine, 2×10^6 globules rouges parasités (dilués dans de l'eau physiologique – NaCl 0,9%), provenant directement de sang de souris infestées, sont inoculés par voie intra-péritonéale. Afin d'obtenir une infection hépatique, les sporozoïtes sont inoculés par voie intraveineuse à raison de $1,5\times10^4$ sporozoïtes (NaCl 0,9%) par inoculum.

L'observation des parasites se fait sur frottis, réalisés en prélevant une goutte de sang à la queue des souris. Les frottis sont fixés au méthanol et colorés pendant 45 minutes au Giemsa (Merck™) dilué à 8 % dans du tampon phosphate (KH_2PO_4 15 mM ; Na_2HPO_4, $12H_20$ 15 mM ; pH 7,2). La parasitémie (nombre de parasites pour 100 hématies) est évaluée sur 2 000 hématies.

3.3. Les cellules

a. Culture et conservation de la lignée cellulaire BJAB

Les cellules BJAB sont maintenues en suspension dans du milieu RPMI 1640 additionné de 2 mM de L-glutamine, 20 mM de bicarbonate de sodium, 25 mM de glucose, 10 mM d'HEPES et 1 mM de pyruvate de sodium et supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal décomplémenté (SVFd) (Sigma®). Les cultures sont maintenues à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO_2 et 90% d'humidité. Le repiquage se fait tous les 3 jours. Les cellules sont collectées par centrifugation (200g, 3 minutes) et une dilution est faite dans un milieu neuf en fonction du nombre de cellules; la culture doit contenir au maximum 3×10^6 cellules/ml. Lorsque ce seuil est atteint, une nouvelle culture est lancée avec 4×10^5 cellules. Pour la conservation, 1×10^7 cellules/ml dans un milieu SVFd/diméthyl sulfoxide (DMSO) (90/10) sont congelées dans l'azote liquide (Steinitz et Klein, 1975; Diller *et al.*, 2005; Bertani, 2006).

3.4. *Anophèles stephensi*

a. Elevage

La méthode d'élevage d'*An. stephensi* a été adaptée de la méthode de Shute et Marion (1966). La température et l'hygrométrie de l'insectarium sont de 23±1°C et 80±5% respectivement. Les imagos sont maintenus dans des cages autoclavables de 50×50×50 cm et de l'eau glucosée (5%) est disponible en permanence. Une fois par semaine, les imagos femelles prennent un repas sanguin sur un lapin anesthésié avec un mélange de Vetranquil® à 1% et d'Imagène®500 à 0,25% (1 ml/kg par voie intramusculaire). Les pontes sont récoltées le 3e jour suivant le repas sanguin et les œufs sont transférés dans une cuvette d'eau. Les larves sont nourries quotidiennement avec des biscuits canins réduits en poudre (sans poisson dans leur composition) supplémentés en Superlevure-Gayelord Hauser® (8%) jusqu'à l'apparition des nymphes. Une fois la mue effectuée, les imagos sont collectés soit dans des cages de "pondeurs", soit dans des cages d'expérience (Bertani, 2006).

b. Production de sporozoïtes de *Plasmodium yoelii yoelii*

Une souris est infectée à J_0 avec des globules rouges infectés par *P. yoelii yoelii*. A J_3, 100 imagos sont nourris avec le sang de la souris anesthésiée. Les moustiques sont ensuite remis en conditions d'élevage pendant 14 jours. A J_{10}, la présence d'oocystes est vérifiée par dissection de l'estomac d'une dizaine de moustique. A J_{17}, les sporozoïtes sont récoltés par dissection du thorax et extractions des glandes salivaires des moustiques (Bertani, 2006).

4. TECHNIQUES PARTICULIERES

4.1. Techniques d'étude de l'activité antipaludique *in vitro*

a. Test de chimiosensiblité de *Plasmodium falciparum*

Les souches de *Plasmodium falciparum* on été travaillées avec une parasitémie ajustée entre 1 et 2% dans les conditions de cultures décrites précédemment. Le test s'effectue en microplaques de 96 puits (TPP, Switzerland) à raison de 200µl par cupule en triples essais. Plusieurs témoins sont également préparés (témoin de croissance et témoin négatif) :

- Puits test: 100µl de solution à tester + 100µl de suspension globulaire (RPMI, SH 10%, L-Glutamine 1%, GRP hématocrite 1,5%),
- Témoin de croissance (sans produit): 100µl RPMI + 100µl suspension globulaire (RPMI, SH 10%, L-Glutamine 1%, GRP hématocrite 1,5%),
- Témoin négatif (hématies saines): 100µl RPMI + 100µl suspension globulaire (RPMI, SH 10%, L-Glutamine 1%, GRS hématocrite 1,5%),

Pour les microtests, nous avons adapté la technique décrite par Desjardins *et al.* (1979). Nous avons fait agir les différentes concentrations d'antipaludiques sur les formes jeunes en anneau des stades sanguins de *Plasmodium falciparum* (obtenues par synchronisation avec 5% D-sorbitol, voir annexe 3). Après 24 h de croissance nous avons ajouté au milieu 0.25 µCi/puit d'hypoxanthine tritiée (l'hypoxanthine est un précurseur de l'acide nucléique, donc un marqueur de croissance). L'incubation a été poursuivie jusqu'à la 48ème heure, puis les plaques on été congelées à -18°C. Elles ont été ensuite décongelées à température ambiante. Cette étape de congélation/décongélation permet une lyse des globules rouges ce qui entraîne la libération des parasites dans le milieu.

b. Détermination de la parasitémie

Une fois les plaques décongelées, les parasites ont été collectés sur un papier filtre au moyen d'un collecteur de cellules. Le papier-filtre est ensuite séché dans un four à chaleur sêche puis placé dans un sac spécial (Sample Bag, Wallac) contenant 5 ml de liquide de scintillation (BetaPlate Scint de Wallac). Le compteur Wallac Microbeta 1450 possède une interface de chargement robotisée, avec des cassettes spéciales. La radioactivité collectée sur chaque puits est alors mesurée, elle est proportionnelle à la croissance parasitaire. L'élimination des déchets radioactifs suit une procédure rigoureuse, avec l'utilisation de poubelles spéciales pour déchets radioactifs, balisées "radioactivité".

c. Détermination des Concentrations Inhibitrices 50% (CI_{50})

La lecture de radioactivité permet de déterminer (par analyse de régression linéaire) la Concentration Inhibitrice 50 (CI_{50}) qui est définie comme la concentration de produit nécessaire pour diminuer de 50% la parasitémie d'une culture mise en

contact avec le produit à tester par rapport à la parasitémie d'une culture témoin de croissance (sans produit).

Chaque parasitémie (exprimée en %) rapportée au témoin de culture, en fonction des concentrations de produit, nous permet d'établir une relation graphique appelée "courbe effet-dose". Grâce à cette courbe et par régression linéaire, nous pouvons déterminer la CI_{50} du produit testé.

d. Evaluation du potentiel antipaludique

Afin d'évaluer le potentiel antipaludique d'un composé, nous avons utilisé l'indice d'activité (IA_{CQ}) par rapport à la chloroquine (CQ) composé antipaludique de référence, selon la formule suivante :

$$\mathbf{IA_{CQ} = CI_{50} \text{ de la CQ} / CI_{50} \text{ de la drogue testée}}$$

Lorsque l'index >1 le produit est plus actif que la CQ
Lorsque l'index = 1 le produit est aussi actif que la CQ
Lorsque l'index < 1 le produit est moins actif que la CQ

e. Détermination du stade érythrocytaire sensible

Tout au long de son développement érythrocytaire, *Plasmodium* ne possède pas la même sensibilité aux différents composés antipaludiques. Par exemple, il a été montré que la chloroquine agissait de façon spécifique sur les trophozoïtes entre la 24ème et la 36ème heure du cycle (Ter-Kuile *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1986; Yayon *et al.*, 1983) (Figure 8). Afin de mieux caractériser le potentiel antipaludique d'un composé, et d'accéder à une meilleure compréhension de son activité sur le parasite, il est donc intéressant de définir le stade de développement érythrocytaire sensible à ce composé.

La connaissance du stade le plus sensible de *P. falciparum* aux drogues est un outil dans la recherche de la meilleure combinaison de drogues pour diminuer les probabilités de développement de résistance par le parasite. *Plasmodium falciparum* se multiplie dans les hématies, selon des cycles de 48 heures, en passant par différents stades asexués sanguins, de la forme annulaire jeune au stade schizonte âgé.

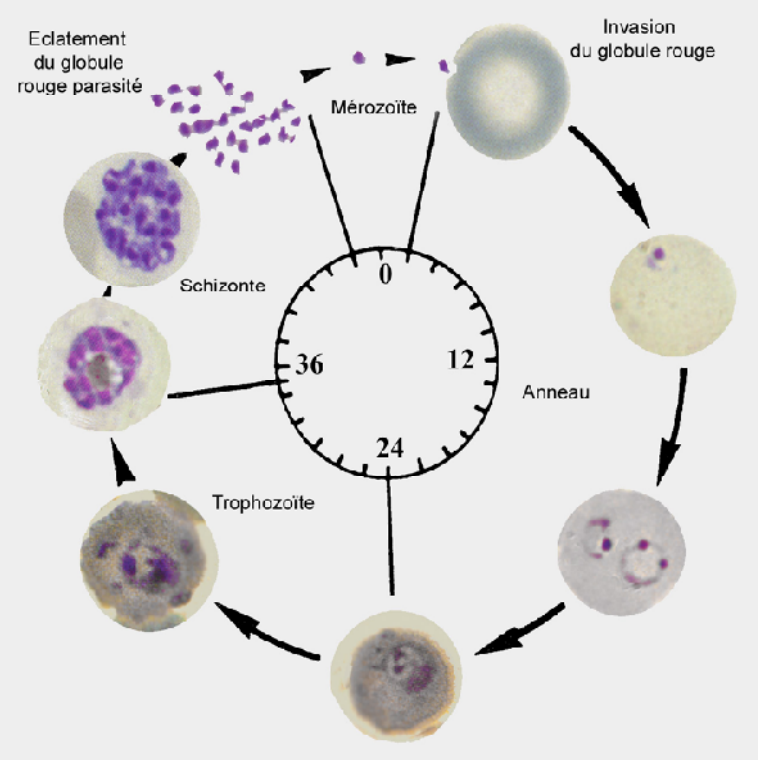


Figure 8. *Représentation schématique du cycle érythrocytaire (en heure) de* Plasmodium falciparum in vitro*. L'apparition des principaux stades de développement est représentée en fonction du temps, pendant les 48h du cycle érythrocytaire.*

Les périodes de 8 heures d'incubation permettent de différenciér les stades suivants : les anneaux jeunes (AJ) entre 0 et 8h ; les anneaux âgés (AA) entre 8 et 16h ; les trophozoïtes jeunes (TJ) entre 16 et 24h ; les trophozoïtes âgés (TA) entre 24 et 32h ; les schizontes jeunes (SJ) entre 32 et 40h ; et les schizontes âgés/mérozoïtes (SA-M) entre 40 et 48h.

f. Synchronisation de la souche

Les essais de stade sensible ont été réalisés sur la souche de référence FcB1 synchronisée par période de 6 heures au moyen de traitements consécutifs avec une solution de sorbitol 5% qui concentre les formes jeunes en lysant les formes âgées (Deharo *et al.*, 2000; Lambros et Vanderberg, 1979; Valentin *et al.*, 1997) et synchronisation par du Plasmion (Laboratoire Fresenius Kabi, France) qui concentre les formes âgées (trophozoïtes âgées et Schizontes) par sédimentation. Ce substitut du plasma a montré de bons résultats avec les souches (K+) qui expriment des « boutons » ou « knobs » à la surface du GRP (Lelièvre *et al.*, 2005); voir annexe 3.

g. Test de stade sensible *in vitro*

Une culture parasitaire synchronisée à 0,5 % de parasitémie a été répartie dans trois plaques de 96 puits (voir chapitre précédent). A partir de T0, toutes les 8 h, des drogues sont apportées a des concentrations 50, 100, 200, 400, 800, 1600, 3200 et 6400 % de la CI_{50} sur une période de 48 h (0, 8, 16, 24, 32, 40 h). Un témoin de croissance et un témoin négatif ont été effectués en parallèle. L'état de développement du parasite a été suivi par coloration de Giemsa et observation au microscope.

Après chaque période d'incubation de 8 h avec la drogue, les GRP sont lavés trois fois avec le milieu RPMI 1640 puis remis en culture avec du milieu de culture RPMI 1640 complémenté de SH et de la L-glut (Benoit-Vical *et al.*, 1998). Après 48 h d'incubation (premier cycle de croissance), 0,25 µCi/puits d'hypoxanthine tritiée sont ajoutes et continué l'incubation jusqu'à la 84ème heure. Puis, les plaques on été congélées à -18 ºC (Whitehead et Peto, 1990). La parasitémie de chaque puits a été mesurée selon la méthode décrite au chapitre précédent. Les résultats sont exprimés en pourcentage de croissance, par rapport à un témoin de culture. Voir le plan de plaque et le protocole à l'Annexe 4 (Valentin *et al.*, 1997).

h. Etude de combinaison de drogues

Nous avons étudié l'association du BM avec des antipaludiques conventionnels. En effet, la politique de santé actuelle privilégie l'association de composés afin de limiter le développement des résistances du parasite. De plus, l'association de composés peut permettre la diminution de la toxicité et/ou des effets secondaires de drogues prises individuellement (Fivelman *et al.*, 2004). La thérapie de combinaison est devenue le standard en clinique pour plusieurs maladies infectieuses où la résistance aux drogues pose problème (par exemple pour la tuberculose et le VIH), et se standardise également pour le paludisme (Ohrt *et al.*, 2002).

Les études *in vitro* de combinaisons de drogues utilisent la technique du test de chimiosensibilité (cf. ci-dessus). Dans ce test, deux composés à évaluer en combinaison sont déposés en dilutions sériées croisées sur une plaque de 96 puits selon le schéma de plaque présenté en Figure 9 et Annexe 5 (Valentin *et al.*, 1997).

Drogue A %CI_{50}	Drogue B %CI_{50}	0%	0%	25%	25%	50%	50%	75%	75%	100%	100%	200%	200%
		1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
	A					**Témoin +**			**Témoin -**				
0%	**B**												
25%	**C**												
50%	**D**												
75%	**E**												
100%	**F**												
200%	**G**												
	H					**Témoin +**			**Témoin -**				

test	100 µL de drogue + 100 µL GRP	**Témoin +**	100 µL RPMI + 100 µL GRP	**Témoin -**	100 µL RPMI + 100 µL GRS	vide

Figure 9. *Représentation schématique du dessin de plaque lors d'une expérience de combinaison de deux composés.* GRP : globules rouges parasités ; GRS : globules rouges sains ; CI_{50} : Concentration Inhibitrice 50.

Les résultats sont analysés selon la méthode des isobologrammes adaptée de De Jongh (1961) : les pourcentages des CI_{50}s de chaque combinaison entre les deux drogues sont calculées et tracées graphiquement (Figure 10) afin de déterminer l'effet de la combinaison (additivité, synergisme, antagonisme).

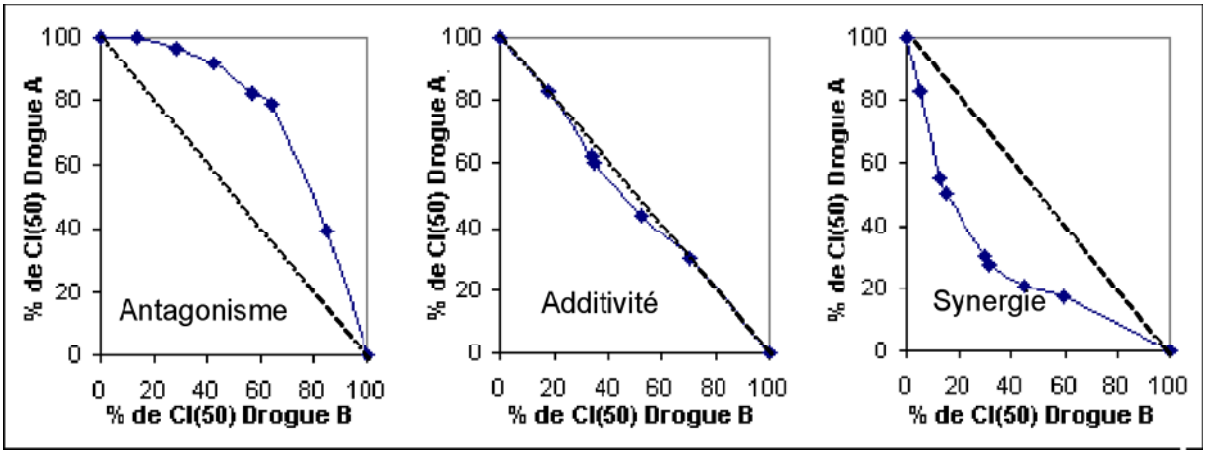


Figure 10. *Représentation graphique des isobologrammes.* Les différents effets combinatoires pouvant être observés (additivité ; synergisme ; antagonisme) sont indiqués. CI_{50} : concentration inhibitrice 50.

Les données ont également été exprimées comme les sommes moyennes des concentrations inhibitrices partielles (FIC), définies comme (CI_{50} de drogue A dans le

mélange/CI_{50} de la drogue A seule) + (CI_{50} de drogue B dans le mélange/CI_{50} de drogue B seule) pour chaque concentration (Berenbaum, 1978 ; Canfield *et al.*, 1995; Ohrt *et al.*, 2002). Les valeurs de FIC sont classées de la manière suivante (Ringwald *et al.*, 1999) :

- FIC > 1, l'association est considérée comme antagoniste
- FIC = 1, l'association est considérée comme additive
- FIC < 1, l'association est considérée comme synergique

4.2. Techniques d'étude de l'activité antipaludique *in vivo*

a. Test suppressif de 4 jours ou test de Peters

Nous avons utilisé la technique décrite par Peters (1970). Sur des lots de cinq souris, l'inoculation est faite par voie intra péritonéale à partir d'une suspension parasitaire de *P. yoelii nigeriensis* avec 100 µl de sang contenant 10^7 GRP par ml (J1). Le traitement commence deux heures après l'infection. Les souris sont traitées per os avec une dose de produit à tester, une fois par jour, pendant quatre jours consécutifs (J1, J2, J3, et J4).

Un lot de 5 souris traitées avec le solvant de la drogue constitue le groupe témoin de l'infection. Chaque concentration de produit (ou combinaison de produits) à tester est administrée à un lot de 5 souris. Au cinquième jour, J5, la parasitémie des souris traitées est évaluée, par microscopie, par rapport au lot témoin et le pourcentage d'inhibition est calculé selon la formule suivante :

$$\frac{\text{(parasitémie du groupe témoin – parasitémie du groupe traité)}}{\text{parasitémie du groupe témoin}} \times 100 = \%\ \text{d'inhibition}$$

La survie des souris est également évaluée par rapport au lot témoin.

b. Evaluation de l'activité sur stades hépatiques (inhibition de l'invasion)

Pour les essais d'inhibition de l'invasion, nous avons utilisé la souche *Plasmodium yoelii yoelii* (Landau, 2005). Le cycle hépatique du parasite est de 48 heures, temps au bout duquel commencent à apparaître les parasites dans la circulation générale.

L'activité des drogues sur les formes hépatiques du cycle (démontrée sur la première génération des formes sanguines) est évaluée par une méthode adaptée de Peters et Robinson (1999). Les parasites sont obtenus à partir de femelles de

moustiques infectées (*An. stephensi*) et maintenus selon la procédure décrite par Deharo *et al*. (2000).

Pour l'obtention des parasites, on place une boîte de Pétri avec du SSN ou du RPMI sur un lit de glace, ensuite les moustiques infectés sont capturés à l'aide d'un capturateur. Le capturateur, qui contient les moustiques, est agité fortement (pour les étourdir). Les moustiques sont alors placés sur une lame où, avec l'aide du biseau de deux aiguilles, est sectionné le col entre la tête et le thorax et finalement sont isolées les glandes salivaires qui contiennent les sporozoïtes (Figure 11).

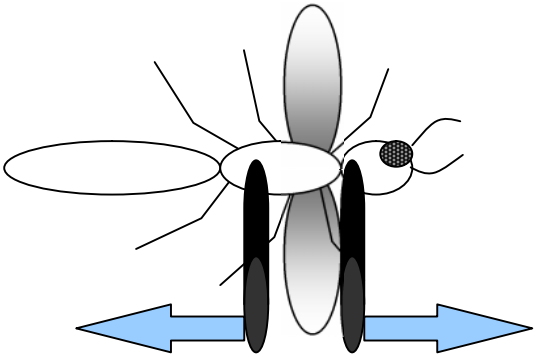


Figure 11. *Section du moustique pour l'extraction des glandes salivaires*

Les glandes salivaires séparées sont déposées dans la boîte de pétri qui contient du SSN ou du RPMI, ceci à l'aide d'une brosse mince. Elles sont agitées pour extraire les parasites qui sont transférés dans un microtube. Après une courte centrifugation (100g, 2 minutes) les sporozoïtes sont récupérés dans le surnageant (Deharo *et al.*, 2000). Approximativement 10^8 sporozoïtes sont collectés pour infecter les souris, (groupe traité avec le BM et groupe contrôle traité avec le solvant de la drogue).

c. Test de l'activité sur stades hépatiques

Sur des lots de trois souris, l'inoculation est faite, par voie intraveineuse (ou intra péritonéale) avec 200 - 500 µl de surnageant. Le traitement en dose unique se fait deux heures après l'infestation à deux fois la DI_{50}. Les souris sont traitées per os une fois par jour, pendant quatre jours consécutifs. La parasitémie est évaluée au microscope sur frottis coloré au Giemsa à 48, 72, 96, 120, 144 et 168 h.

Les animaux ne présentant pas d'infection sanguine à J_{14} sont considérés comme sains. La primaquine a été utilisée comme contrôle à une dose de 60 mg/kg.

4.3. Techniques d'étude de la cytotoxicité

a. Test de cytotoxicité

Les tests de cytotoxicité sont pratiqués sur des cellules BJAB en phase exponentielle de croissance (1.10^6 cellules/ml et 200 µl/puits) en présence de différentes concentrations de drogue à tester, préalablement dissoute dans du RPMI, dans une plaque de 96 puits (TPP, Switzerland). Un témoin de viabilité contenant du RPMI, est effectué parallèlement.

Après 24 heures d'incubation à 37°C dans l'étuve, les cellules sont marquées en remplaçant 200µl de milieu de culture par 200µl de milieu de culture marquée avec de la [^{3}H]-thymidine (0,5 µCi/puits) (PerkinElmer, Courtaboeuf, France) qui s'incorpore dans l'ADN des cellules. Les plaques sont remises à incuber pendant 16 heures puis congelées. Les cellules sont comptées par lecture de la radioactivité selon la procédure décrite précédemment (Tewari *et al.*, 1995).

b. Détermination des Concentrations Toxiques 50% (CT_{50})

Pour la détermination des CT_{50} nous avons employé la procédure d'analyse de régression linéaire décrite précédemment (Test de chimiosensiblité de *Plasmodium falciparum*) puisque l'effet mesuré est la mortalité cellulaire.

c. Détermination d'un index de sélectivité (IS)

L'Index de Sélectivité de l'activité antiplasmodiale correspond au rapport entre la cytotoxicité sur cellules humaines CT_{50} et la CI_{50} sur le parasite (Vennerstrom *et al.*, 1995). Il est calculé pour chaque produit selon la formule:

$$\mathbf{I\ S = CT_{50} / CI_{50}}$$

4.4. Etude des mécanismes d'action

a. Modèle pharmacologique sur l'interaction hème/glutathion

Des études antérieures (Cohn et Lyle, 1966; Hissin et Hilf, 1976; Antoine *et al.*, 1999) ont montré que le GSH pouvait réagir, d'une façon très spécifique avec l'O-

phthalaldehyde (OPA) donnant lieu à un adduit fortement fluorescent GSH-OPA avec des spectres d'excitation/émission à 350 et 420 nm respectivement (Hissin et Hilf, 1976; Neuschwander-Tetri et Roll, 1989). Sur cette base, nous avons développé un nouvel essai *in vitro* pour suivre la dégradation de l'hème par le GSH par spectroscopie de fluorescence. Nous avons tout d'abord déterminé par CLHP, les conditions optimales de l'essai.

a.1. Préparation des produits à tester

Les différents antipaludiques on été préparés à 10 mM dans du Méthanol ou dans du tampon HEPES, puis dilués dans du tampon HEPES à 0,3 mM. Toutes les préparations ont été conservées à l'abri de la lumière, à 4°C, dans des flacons en verre stériles. Les concentrations finales dans la plaque étaient de 50 µM.

a.2. Étude de l'interaction hème-glutathion

L'adduit fluorescent OPA-GSH a été détecté par spectrophotométrie à 37 °C dans du tampon HEPES. Les solutions de GSH (0,3 mM), OPA (17,5 mM) et hème (0,3 mM) ont été fraîchement préparées. L'émission de fluorescence a commencé avec l'addition de 25 µl d'OPA. Les drogues ont été incubées avec le GSH et l'hème pendant 30 min et les intensités de fluorescence ont été mesurées à t=0 et à t=30 min. Juste avant la mesure de fluorescence à 0 et 30 min d'incubation, l'OPA a été ajouté et les plaques ont été agitées pendant 10 s avec un rayon d'agitation de 1 mm.

Les mélanges suivants: drogue / GSH (50 µM / 50 µM), drogue / hème (50 µM / 50 µM), drogue / OPA (50 µM / 2,5 mM), hème / OPA (50 µM / 2,5 mM), GSH / OPA (50 µM / 2,5 mM) et tampon HEPES / OPA (0,2 M / 2,5 mM) ont été employés comme contrôles. La réduction de fluorescence obtenue avec l'hème-GSH entre t=0 et t=30 min était le contrôle "positif". Les résultats ont été exprimés en tant que moyennes de % de GSH restant après 30 min. L'intensité de fluorescence à t=0 min correspond à 100 % de GSH. Le % de GSH restant a été défini comme:

$$\% \text{ de GSH restant} = [\text{Fluorescence } (t=30 \text{ min}) / \text{Fluorescence } (t=0 \text{ min}) \times 100]$$

L'analyse statistique a été exécutée avec le logiciel de STATA 7,0; le test t de Student a été employé pour comparer les valeurs de % de GSH restant (dans notre

cas le variable «% de GSH restant» est aléatoire, continue et les données provenant des essais indépendantes ; un essai effectué sur quelques données en utilisant le test Kolmogorov-Smirnov a montré que leur distribution était normale).

a.3. Essai de fixation à l'hémozoïne par spectrophotométrie UV VIS

Préparation des produits à tester

Le BM a été pesé et dissout à 1,56 mM dans du Méthanol, puis redilué avec du Méthanol à 62,6, 31,3, 15,6 et 3,1 µM. Les préparations ont été conservées à l'abri de la lumière, à 4°C, dans des flacons en verre stériles.

Étude de spectrophotométrie UV-Vis pour la détermination des interactions BM-hème

La solution d'hème à 10 µM a été préparée, au début de l'expérience, à partir d'une solution mère à 10 mM dans du Méthanol avec quelques gouttes d'ammoniaque (5), pour faciliter la dissolution (Pashynska *et al.*, 2004). La solution a été chauffée un peu pour assurer la dissolution complète. Dans ces conditions le monomère prédomine.

Pour la lecture, des mélanges à volumes égaux de solution d'hème avec les solutions de BM ont été préparés. La lecture a été faite entre 300-750 nm pour obtenir les différents spectres et le comportement du BM (655-675 nm) et de l'hème (380-400) ont été suivis (Kelly *et al.*, 2001). Les mélanges ont été incubés à 37°C pendant 96 h et des lectures ont été faites à 0, 24, 36, et 96 h.

a.4. Essai de fixation à l'hème par chromatographie sur couches minces CCM

Étude de CCM pour la détermination des interactions BM-hème

Le BM a été pesé et dissout et une solution d'hème à 10 µM a été préparée selon le procédure décrite au paragraphe précèdent (Essai de fixation à l'hémozoïne par spectrophotométrie UV VIS). Des mélanges, à volumes égaux, de solution d'hème avec les dilutions de BM ont été préparés et déposés sur chromatoplaques de silice (100 µl). Les plaques ont été développées en employant différentes phases mobiles, mais c'est avec la phase mobile chloroforme/méthanol (25/75) que nous avons obtenu les meilleurs résultats. Les plaques ont été lues à 254 et 365 nm et dans le visible.

a.5. Essai de fixation à l'hème par spectrométrie de masse

Étude de masse pour la détermination des interactions faibles BM-hème

Le BM a été pesé et dissout à 1 mM dans du méthanol. Une solution d'hème à 1 mM a été préparée selon le procédure décrite au paragraphe précèdent (Essai de fixation à l'hémozoïne par spectrophotométrie UV VIS). Un mélange, v/v (100 µl) de solution d'hème avec le BM a été préparé. 200 µl de méthanol ont été ajoutés (concentration finale d'hème et de BM 0,25 mM). L'échantillon a été dilué juste avant la lecture (1-10). Le pH des échantillons étant voisin de 7, l'atome de fer dans l'hème est sous forme Fe(III) (Pashynska *et al.*, 2004).

Les données spectrales de masse ont été obtenues en mode d'ion positif sur un spectromètre de masse de triple quadrupole (Perkin-Elmer Sciex Instruments, Micromass, Manchester, R-U) équipé d'une source electrospray d'ionisation (voir Annexe 6).

III. RESULTATS

1. ÉVALUATION *IN VITRO* DE L'ACTIVITE ANTIPALUDIQUE SUR LES SOUCHES DE *PLASMODIUM FALCIPARUM*

1.1. Détermination des profils de chimiosensibilité des souches F32, HB3, FcB1 et FcM29 de *P. falciparum*

L'activité des 9 composés antipaludiques, ainsi que celle du BM, a été évaluée sur les 4 souches de *P. falciparum* (F32, HB3, FcM29 et FcB1). Les résultats sont présentés dans les tableaux 7 et 8.

Drogues	CI_{50} (nM)				Valeurs limites (nM) *
	F32	HB3	FcB1	FcM29	
AMO	19	23	22	33	S < 40 ; R > 60
ART	0,4	10	14	16	S < 8 ; R > 12
ATO	20	0,1	22	188	R > 7
CQ	70	36	186	600	S < 80 ; R > 100
DOX	26 185	4 446	12 540	22 632	R > 9 600
MEF	401	31	16	106	S < 15 ; R > 30
PRI	4 627	ND	432	1 320	ND
PYR	6 882	ND	97	21 774	R > 2 000
Q	835	208	423	331	S < 500 ; R > 800

Tableau 7. *Activités antipaludiques* in vitro *de différents antipaludiques sur les souches de* P. falciparum *F32, HB3, FcB1 et FcM29.* CI_{50} : concentration inhibitrice 50% ; S : sensible ; R : résistante ; ND : non déterminé. * Informations fournies par le CNRCP Antilles-Guyane, Institut Pasteur de la Guyane.

1.2. Activité antipaludique du bleu de méthylène *in vitro*

Les CI_{50}s enregistrées pour le BM sont reportées dans le tableau 8:

Souche de *P. falciparum*	CI_{50} (nM)	IA_{CQ}s
F32	5 +/- 2	14
HB3	4 +/-1	9
FcB1	8 +/- 2	23
FcM29	5 +/- 2	120

Tableau 8. *Concentrations inhibitrices 50 (CI_{50}s) obtenues pour le BM avec les souches F32, HB3, FcB1, FcM29 de* P. falciparum.

Les indices d'activité par rapport à la chloroquine (IA_{CQ}s) calculés pour le BM sont donc pour les souches chloroquino-sensibles de 14 et 9 (F32 et HB3,

respectivement) ; et pour les souches chloroquino-résistantes de 23 et 120 (FcB1 et FcM29, respectivement).

2. DETERMINATION *IN VITRO* DU STADE ERYTHROCYTAIRE DE *PLASMODIUM FALCIPARUM* SENSIBLE AUX COMPOSÉS

2.1. Détermination du stade sensible au bleu de méthylène *in vitro*

Le stade de développement érythrocytaire sensible au BM a été déterminé sur la souche FcB1. Les résultats sont présentés dans la Figure 12.

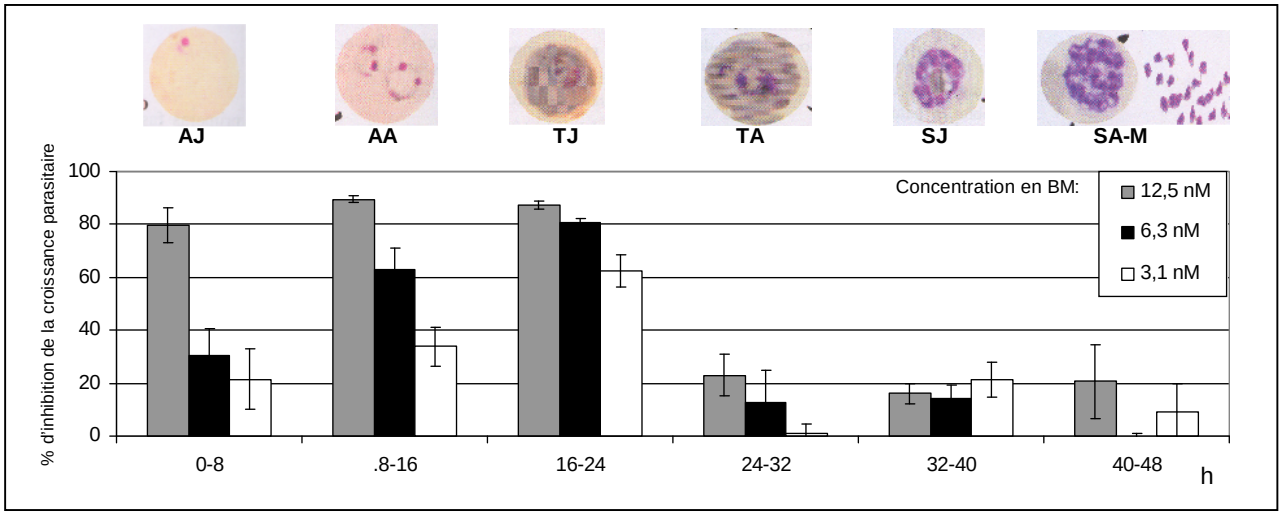


Figure 12. *Pourcentage d'inhibition* in vitro *induit par le BM à 12,5, 6,3 et 3,1 nM en fonction de la période du cycle érythrocytaire de* P. falciparum. AJ : Anneaux Jeunes ; AA : Anneaux Agés, TJ : Trophozoïtes Jeunes ; TA : Trophozoïtes Agés ; SJ : Schizontes Jeunes ; SA-M : Schizontes Agés/Mérozoïtes ; BM : bleu de méthylène.

Les résultats obtenus montrent que les pourcentages d'inhibition de la croissance parasitaire sont les plus hauts en début de cycle, puis ils diminuent.

2.2. Détermination du stade sensible à la quinine *in vitro*

Les résultats du stade de développement érythrocytaire sensible à la Q, sur la souche FcB1, sont présentés dans la Figure 13.

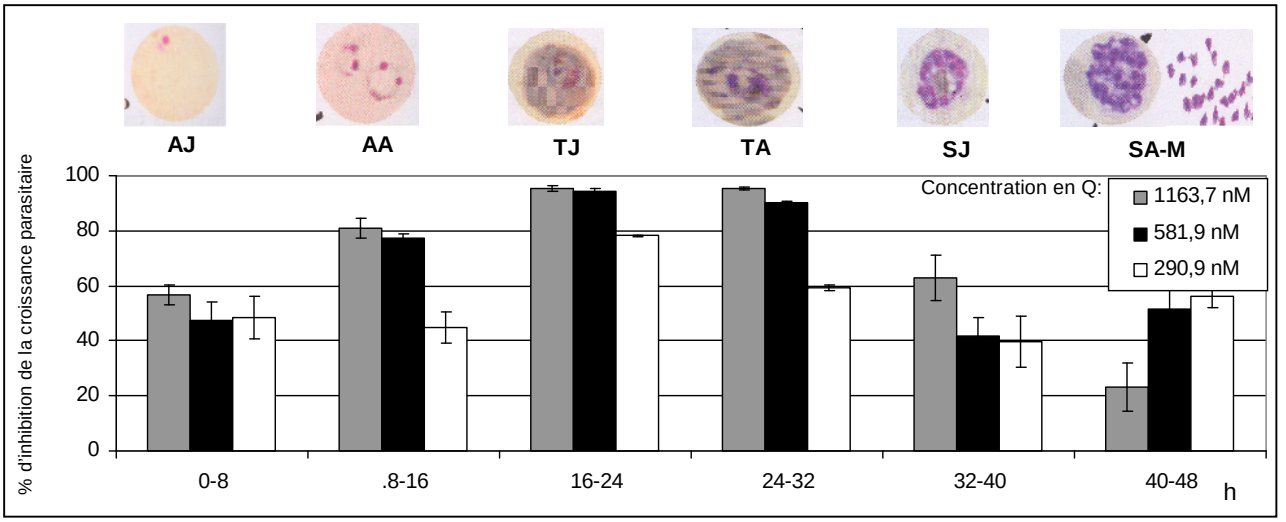


Figure 13. *Pourcentage d'inhibition* in vitro *induit par la Q à 1163,7, 581,9 et 290,9 nM en fonction de la période du cycle érythrocytaire de* P. falciparum. AJ : Anneaux Jeunes ; AA : Anneaux Agés, TJ : Trophozoïtes Jeunes ; TA : Trophozoïtes Agés ; SJ : Schizontes Jeunes ; SA-M : Schizontes Agés/Mérozoïtes ; Q : Quinine.

Les résultats obtenus montrent les valeurs de pourcentages d'inhibition de la croissance parasitaire les plus hautes au début du cycle jusqu'à la 32ème heure; ensuite les valeurs diminuent et montrent la faible sensibilité des schizontes et des mérozoïtes de *P. Falciparum* FcB1 à la Q. Ce qui confirme la plus haute activité de la Q au début du cycle sur les parasites au stade anneaux – trophozoïtes.

2.3. Détermination du stade sensible à la chloroquine *in vitro*

Les stades de développement érythrocytaire de *P. falciparum* FcB1 les plus sensibles à la CQ sont présentés sur la Figure 14.

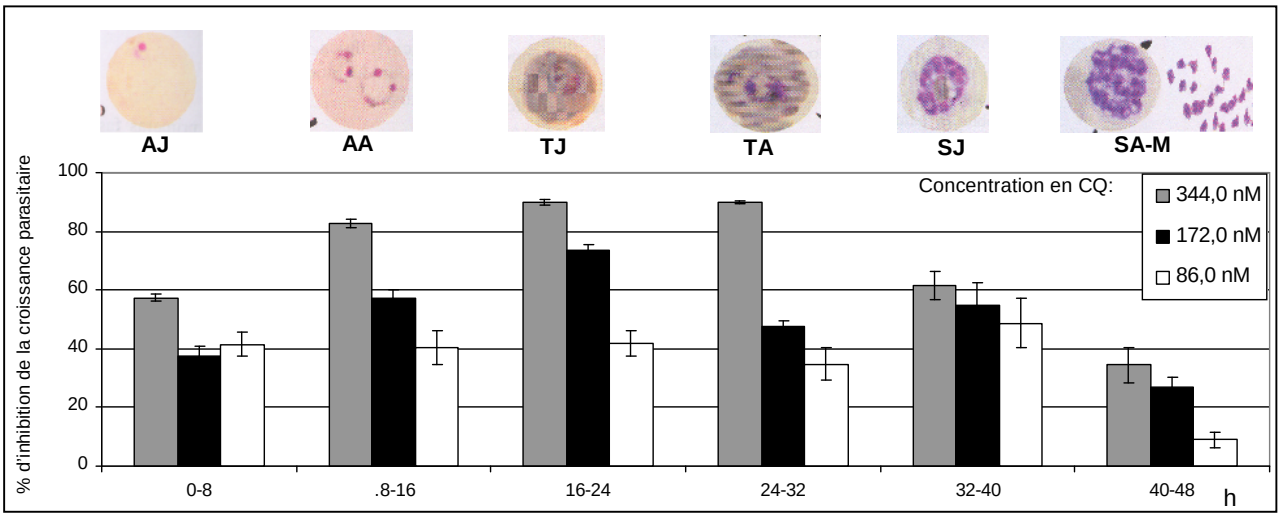


Figure 14. *Pourcentage d'inhibition* in vitro *induit par la CQ à 344,0, 172,0 et 86,0 nM en fonction de la période du cycle érythrocytaire de* P. falciparum. AJ : Anneaux Jeunes ; AA : Anneaux Agés, TJ : Trophozoïtes Jeunes ; TA : Trophozoïtes Agés ; SJ : Schizontes Jeunes ; SA-M : Schizontes Agés/Mérozoïtes ; CQ : Chloroquine.

Les résultats obtenus montrent que les valeurs de pourcentages d'inhibition de la croissance parasitaire les plus hautes sont obtenues pour les stades anneaux âgés, trophozoïtes jeunes et trophozoïtes âgées; puis les valeurs diminuent et montrent la faible sensibilité des schizontes âgés et des mérozoïtes.

2.4. Détermination du stade sensible à l'artéméther *in vitro*

Le stade de développement érythrocytaire sensible à l'ART a été déterminé sur la souche FcB1. Les résultats sont présentés dans la figure 15.

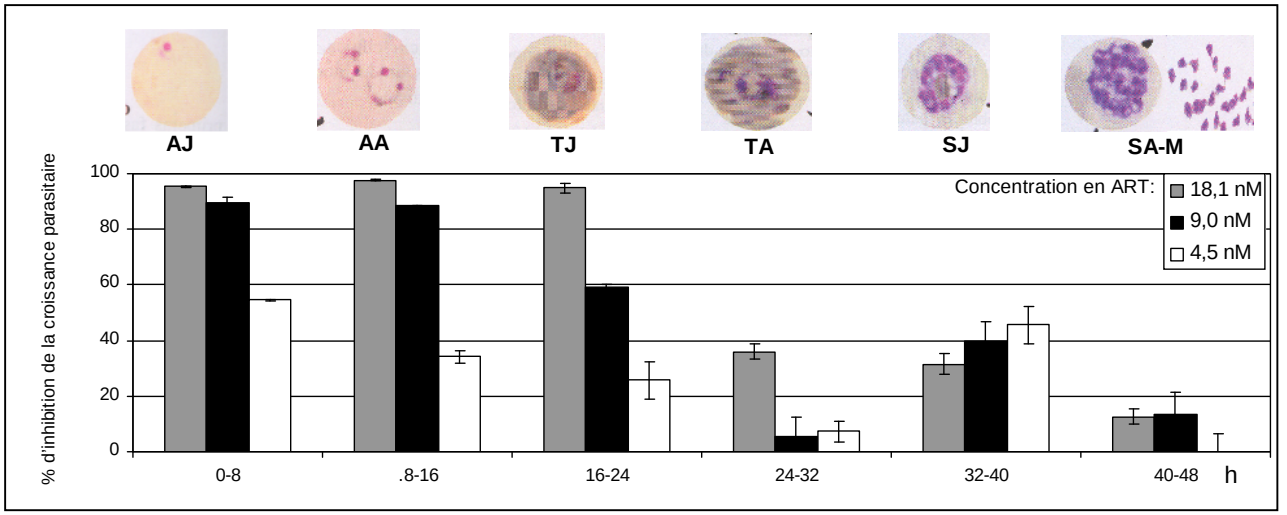


Figure 15. *Pourcentage d'inhibition* in vitro *induit par l'ART à 18,1, 9,0 et 4,5 nM en fonction de la période du cycle érythrocytaire de* P. falciparum. AJ : Anneaux Jeunes ; AA : Anneaux Agés, TJ : Trophozoïtes Jeunes ; TA : Trophozoïtes Agés ; SJ : Schizontes Jeunes ; SA-M : Schizontes Agés/Mérozoïtes ; ART : Artéméther.

Les résultats obtenus montrent que les valeurs de pourcentages d'inhibition de la croissance parasitaire sont hautes au début du cycle puis elles diminuent vers la fin du cycle ; les valeurs sont semblables à celles obtenues avec le BM.

3. ETUDE *IN VITRO* DE LA COMBINAISON ENTRE LE BLEU DE METHYLENE ET DIVERS COMPOSES ANTIPALUDIQUES

3.1. Combinaison entre le bleu de méthylène et l'amodiaquine

L'isobologramme présenté dans la Figure 16 correspond à la combinaison du BM avec l'AMO; il est convexe par rapport à la droite d'additivité car il signe un effet antagoniste.

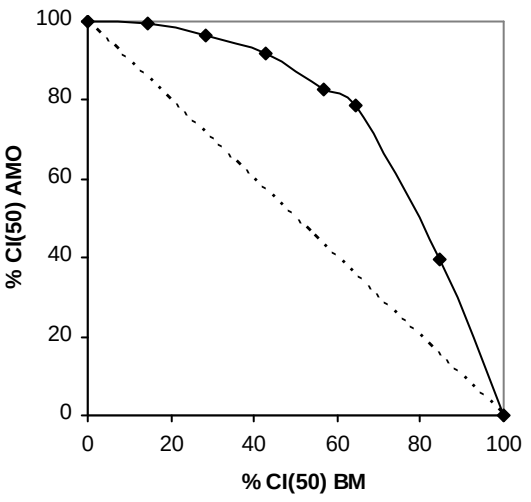


Figure 16. *Isobologramme de la combinaison BM et AMO*

Les valeurs des sommes FIC obtenues avec l'association BM/AMO sont toutes supérieures à 1 et la moyenne est 1,28+/-0,11.

3.2. Combinaison entre le bleu de méthylène et l'artéméther

La combinaison BM/ART est additive/pas d'interaction puisque l'isobologramme se situe proche de la droite d'additivité (Figure 17).

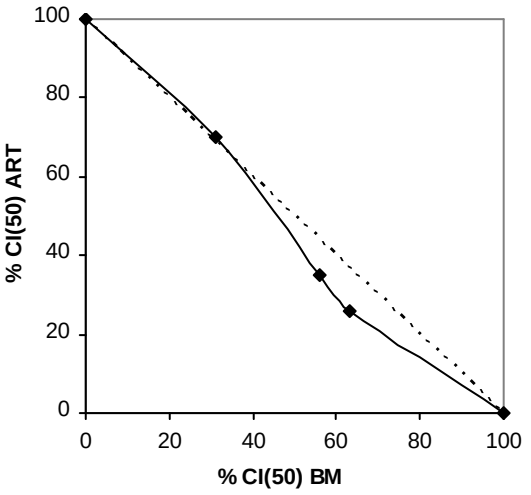


Figure 17. *Isobologramme de la combinaison BM et ART.*

Les valeurs des sommes FIC obtenues se situent près de 1; la moyenne est de 0,95+/-0,05.

3.3. Combinaison entre le bleu de méthylène et l'atovaquone

La Figure 18 présente l'isobologramme correspondant à la combinaison du BM avec l'ATO; la courbe est convexe par rapport à la droite d'additivité. Cela signe un effet antagoniste.

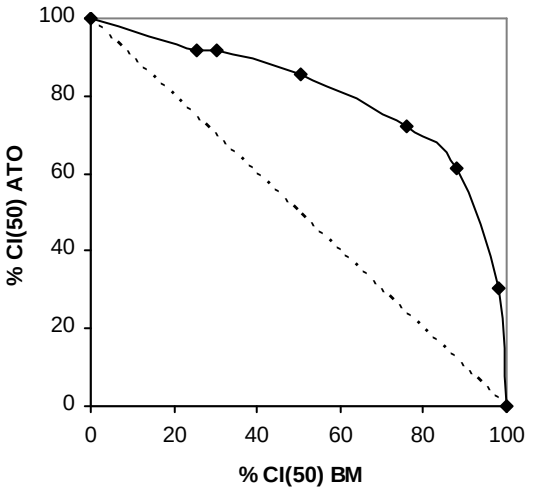


Figure 18. *Isobologramme de la combinaison BM et ATO.*

Les valeurs des sommes FIC obtenues pour la combinaison de BM/ATO, sont supérieures à 1 sauf pour deux valeurs (0,941 et 0,966, déterminations 10 et 11 respectivement); la moyenne est 1,24+/-0,17. Malgré ces deux points, les intervalles de confiance (moyenne+/-ecartype) ne touchent pas l'unité car l'interaction est de type antagonisme/additivité.

3.4. Combinaison entre le bleu de méthylène et la chloroquine

L'isobologramme de la combinaison BM/CQ se situe parallèlement de part et d'autre de la droite d'additivité (Figure 19). Les valeurs des sommes FIC obtenues pour la combinaison BM/CQ se situent autour de 1 et la moyenne est 1,03+/-0,08 signant l'additivité / pas d'interaction.

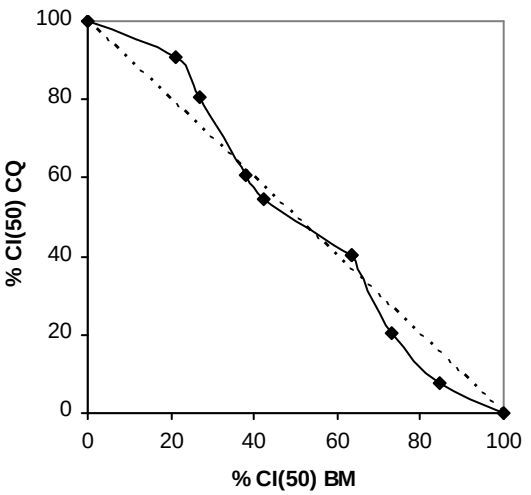


Figure 19. *Isobologramme de la combinaison BM et CQ.*

3.5. Combinaison entre le bleu de méthylène et la doxycycline

L'isobologramme correspondant à la combinaison du BM avec la DOX est convexe par rapport à la droite d'additivité et représente un effet antagoniste Figure 20.

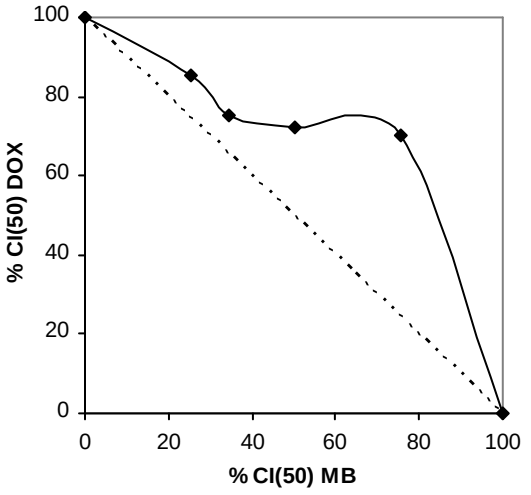


Figure 20. *Isobologramme de la combinaison BM et DOX.*

Les valeurs des sommes FIC obtenues pour la combinaison BM/DOX, présentent des valeurs élevées (7 valeurs > 1,5) et une grande variabilité (ecartype 0,28), la moyenne est 1,44+/-0,28 ; l'interaction est antagoniste.

3.6. Combinaison entre le bleu de méthylène et la méfloquine

La combinaison entre le BM et la MEF a donné lieu à l'isobologramme de part et d'autre de la droite d'additivité montrant une interaction additive/pas d'interaction,

Figure 21. Les valeurs des sommes FIC obtenues pour la combinaison du BM avec la MEF présentent une moyenne de 0,97+/-0,12.

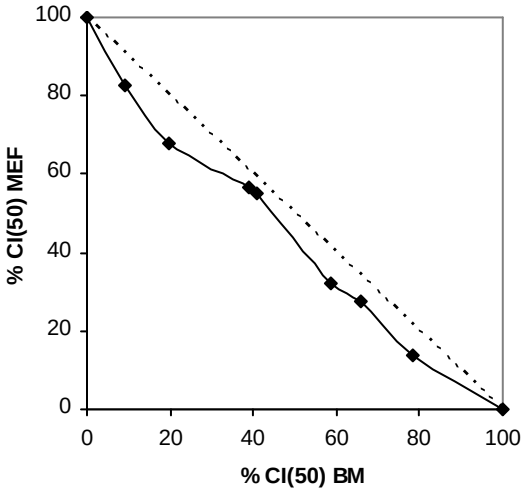


Figure 21. *Isobologramme de la combinaison BM et MEF.*

3.7. Combinaison entre le bleu de méthylène et la primaquine

L'isobologramme de la combinaison entre BM et PRI se situe de part et d'autre de la droite d'additivité donc l'interaction est additive / pas d'interaction Figure 22.

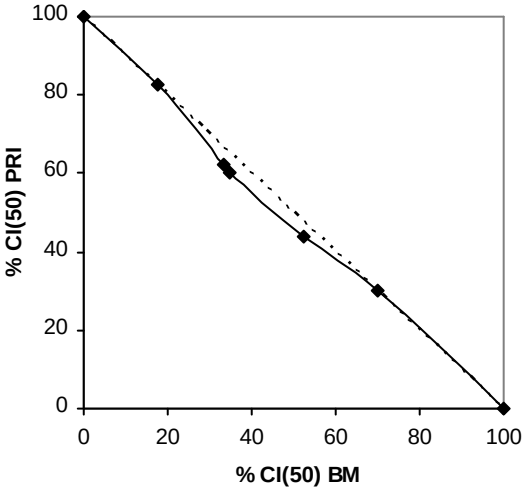


Figure 22. *Isobologramme de la combinaison BM et PRI.*

Les valeurs des sommes FIC obtenues pour la combinaison du BM avec la PRI, sont proches de 1, la moyenne est 0,93+/-0,08 l'interaction est additivité / pas d'interaction.

3.8. Combinaison entre le bleu de méthylène et la pyriméthamine

L'isobologramme correspondant à la combinaison du BM avec la PYR est convexe par rapport à la droite d'additivité et signe un effet antagoniste/additivité Figure 23.

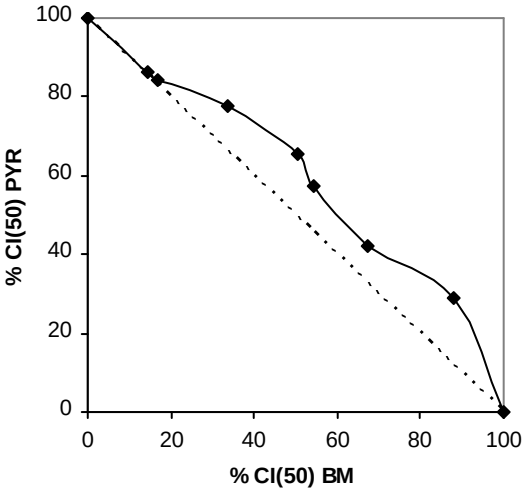


Figure 23. *Isobologramme de la combinaison BM et PYR.*

Les valeurs des sommes FIC obtenues pour la combinaison du BM avec la PYR sont proches de 1 (les déterminations 7 et 8 ont donné lieu à des points très proches de l'unité 1,006 et 1,009); la moyenne est 1,15+/-0,10 l'interaction est de type antagonisme/additivité.

3.9. Combinaison entre le bleu de méthylène et la quinine

L'isobologramme représenté dans la Figure 24 est concave par rapport à la droite d'additivité. Il signe un effet synergique entre le BM et la Q.

Les valeurs des sommes FIC obtenues pour la combinaison du BM avec la Q sont toutes inférieures à 1 et la moyenne est 0,74+/-0,11 car l'interaction est synergique.

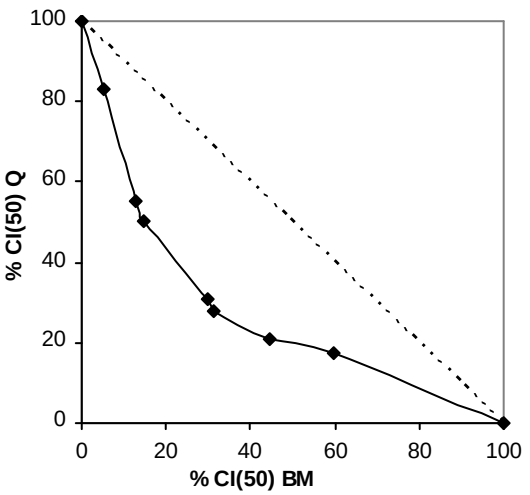


Figure 24. *Isobologramme de la combinaison BM et Q*

4. TECHNIQUE D'ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIPALUDIQUE *IN VIVO*

4.1. Test suppressif de 4 jours ou test de Peters

La DI_{50} observée pour la CQ est de 1,21 mg/Kg et pour le BM est de 14,82 mg/Kg Figure 25.

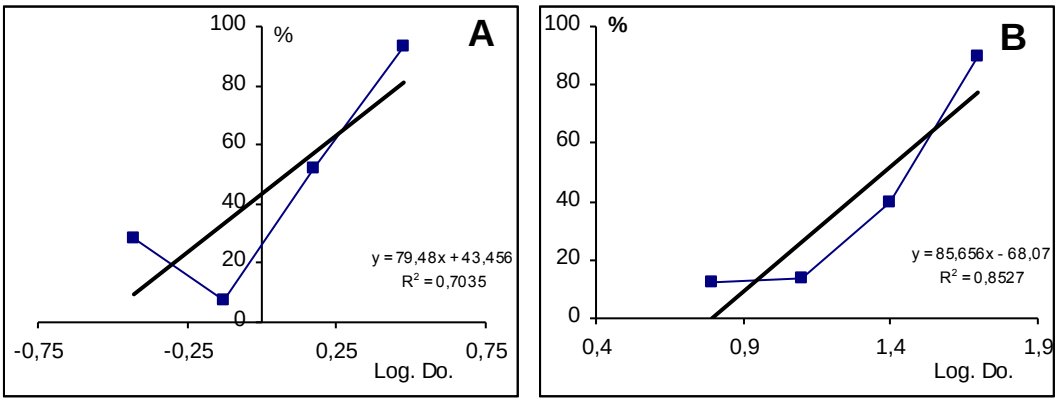


Figure 25. *Détermination des doses inhibitrices 50% (DI_{50}) de CQ et BM ; (A) CQ, (B) BM.*

4.2. Evaluation de l'activité sur stades hépatiques (inhibition de l'invasion)

Nous avons évalué préliminairement l'activité du BM administré à la dose de 100 mg/Kg sur les stades hépatiques de *Plasmodium yoelii yoelii*. Un léger retard dans le développement de l'infection dans le groupe traité avec le BM est observé (Figure

26). Mais cela est insuffisant pour conclure à l'activité sur les stades hépatiques car une substance active à ce niveau doit inhiber complètement le développement de l'infection sanguine.

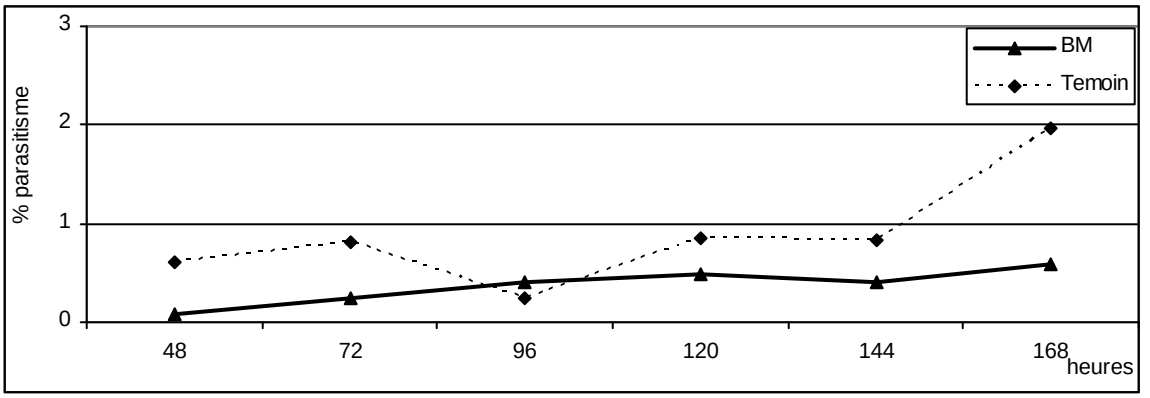


Figure 26. *Essai d'inhibition de l'invasion. Moyenne de trois souris.*

5. TECHNIQUE D'ETUDE DE LA CYTOTOXICITE

5.1. Essais préliminaires

a. Optimisation de la concentration cellulaire pour les essais

Afin de déterminer la concentration cellulaire qui donne la meilleure réponse dans les conditions de l'essai, nous avons déterminé le niveau de radioactivité coups par minute (CPM) à différentes concentrations cellulaires (figure 27).

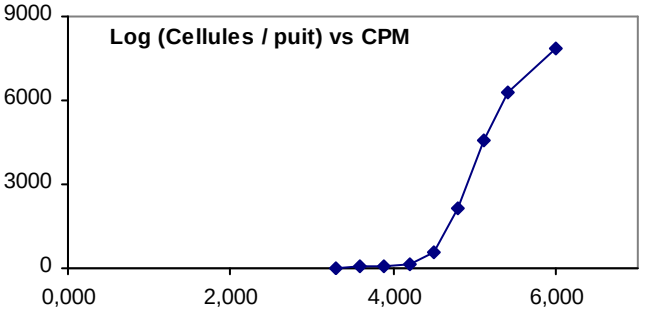


Figure 27. *Relation de concentration cellulaire vs radioactivité (CPM radioactivité).*

b. Détermination d'un contrôle de cytotoxicité

Nous avons sélectionné comme contrôle de cytotoxicité la doxorubicine, qui dans nos conditions de culture, a présenté une CT_{50} de 416 nM Figure 28.

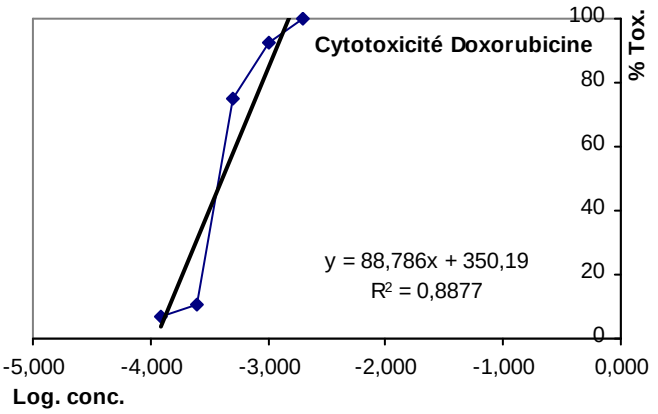


Figure 28. *Contrôle de cytotoxicité (doxorubicine).*

5.2. Test de cytotoxicité

Le BM, présente une CT_{50} = 577+/-12 nM. Cette valeur de CT_{50} est au même niveau que celle l'obtenue avec la doxorubicine et est loin de la valeur obtenue avec la CQ. (11,563 +/- 1647 nM) ; Figure 29.

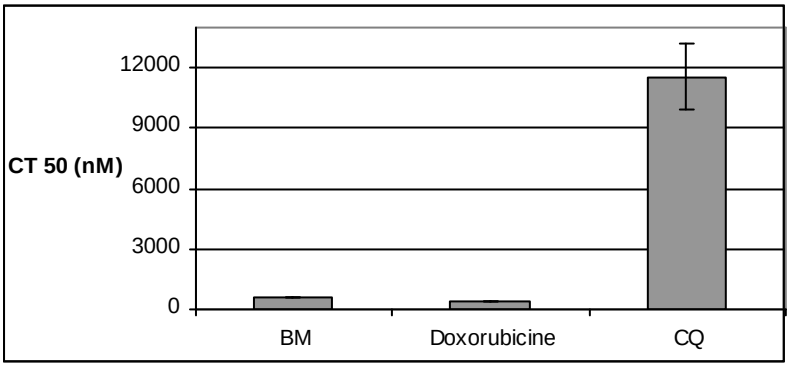


Figure 29. *CT_{50} des drogues étudiées.*

5.3. Index de sélectivité (IS)

Les IS des drogues étudiées sur des souches de *P. falciparum* F32, HB3, FcB1 et FcM29 sont présentées dans la Figure 30. Ils sont calculés en divisant la CT_{50} de la drogue sur les cellules BJAB par la CI_{50} de la drogue sur une souche de *Plasmodium falciparum in vitro*.

	BJAB/F32	BJAB/HB3	BJAB/FcB1	BJAB/FcM29
BM	115	144	72	115
CQ	165	321	62	19

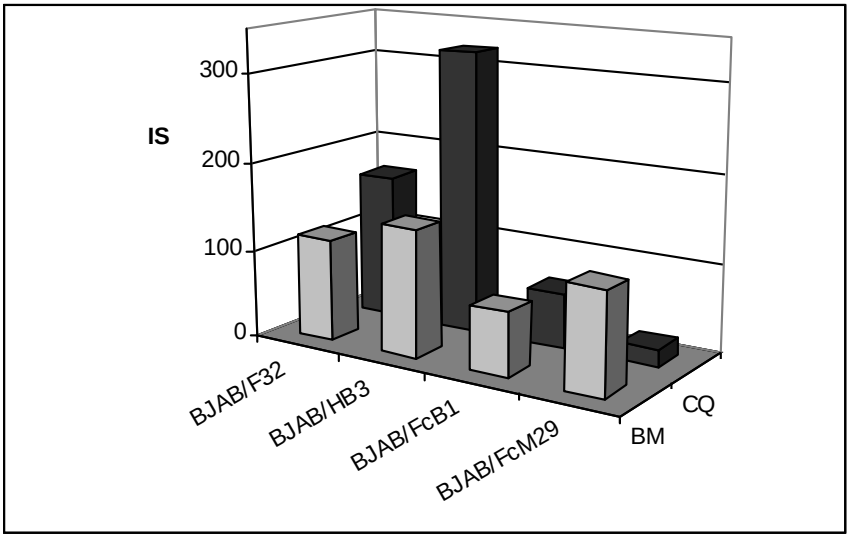


Figure 30. *Index de sélectivité des drogues étudiées.*

6. ETUDE DES MECANISMES D'ACTION

6.1. Modèle pharmacologique sur l'interaction hème/glutathion

La détection de l'adduit OPA-GSH a été optimisée par CLHP selon Cereser *et al.* (2001). Les analyses ont été developées autour des longueurs d'onde λex. = 350 nm et λem. = 420 nm (Hissin et Hilf, 1976; Scaduto, 1988; Camera *et al.*, 2001), les données ont été acquises et traitées sur un poste de travail (Waters millenium workstation). Une colonne Inertsil ODS-2, C18 a été employée pour séparer l'adduit OPA-GSH de GSH et d'OPA. La température de la colonne a été maintenue à 37 °C, la phase mobile (mode isocratique) était un mélange de 35 % et 65 % de CH_3CN et de solution tampon acétate de sodium (50 mM, pH 6,2), respectivement. Le débit était à 0,7 ml/min et 20 µl de l'échantillon ont été injectés. Après l'optimisation de la détection de l'adduit OPA-GSH par chromatographie liquide, l'interaction hème-GSH a été également étudiée, dans les mêmes conditions expérimentales.

Les paramètres expérimentaux principaux des deux réactions étudiées (dérivation de GSH et interaction d'hème-GSH) étaient: la température d'incubation, l'atmosphère (O_2, N_2), le pH, et les proportions d'OPA/GSH et hème/GSH.

a. Essais préliminaires

En utilisant le BM, l'impact du temps d'incubation et de la température ont été évalués. L'essai a été mené pendant 60 min avec des observations toutes les 20 min (t=0, 20, 40 et 60 min).

a.1. Stabilité du bleu de méthylène

L'évolution de la stabilité du BM dans les conditions de l'essai est présentée dans la Figure 31, qui montre les Unités de Fluorescence Relative (UFR) mesurées à t= 0, 20, 40 et 60 min., ainsi que la valeur obtenue sans addition d'OPA.

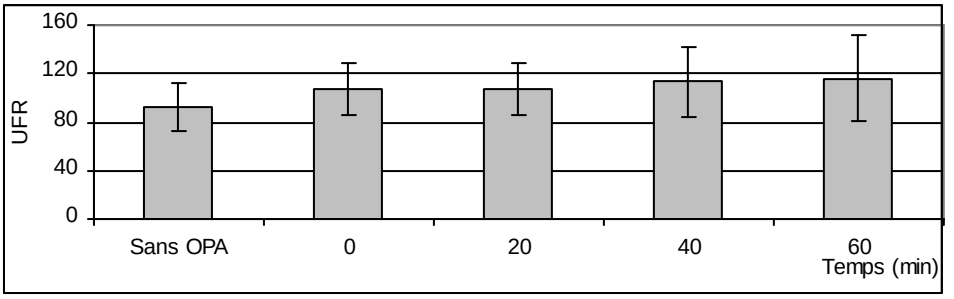


Figure 31. *Stabilité du bleu de méthylène.* Moyenne+/- Ecartype.

a.2. Stabilité du Glutathion réduit

La valeur de l'UFR pour le GSH sans l'OPA est très basse par rapport aux valeurs obtenues à différents temps avec l'OPA, démontrant l'interaction entre le GSH et l'OPA décrite précédemment et illustrée dans la Figure 32 (base fondamentale de cette nouvelle technique). Les valeurs enregistrées pour l'adduit GSH-OPA sont les plus élevées.

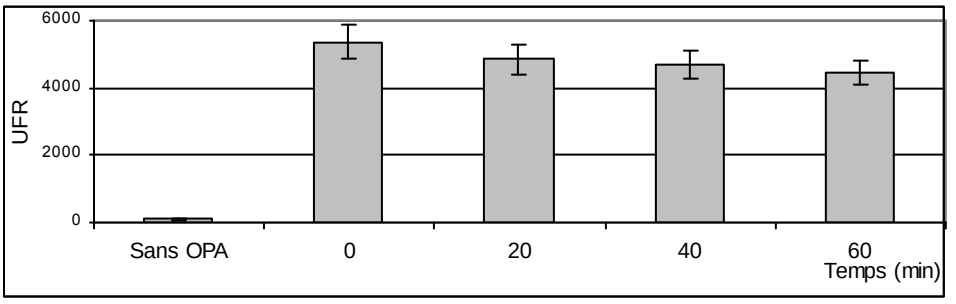


Figure 32. *Stabilité du Glutathion réduit.* Moyenne+/- Ecartype.

a.3. Stabilité de l'hème

Dans les conditions de l'essai, la fluorescence de l'hème sans OPA n'est pas significativement différente de celle obtenue après l'addition de l'OPA et ne varie pas tout au long du temps d'observation (Figure 33).

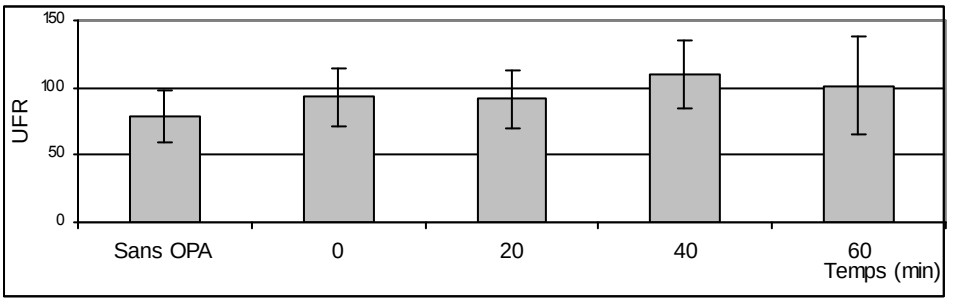


Figure 33. *Stabilité de l'Hème.* Moyenne+/- Ecartype.

a.4. Stabilité de l'o-phthalaldehyde

Au cours de l'essai, la fluorescence générée par l'OPA (2,5mM) a été mesuré au début en l'ajoutant comme réactif supplémentaire (première colonne de la figure 34). Puis l'OPA a été ajouté comme révélateur selon le protocole de l'essai (25 µl, 17,5 mM juste avant la lecture de fluorescence). Les lectures ont été effectuées à *T 0, 20, 40, et 60 min.*

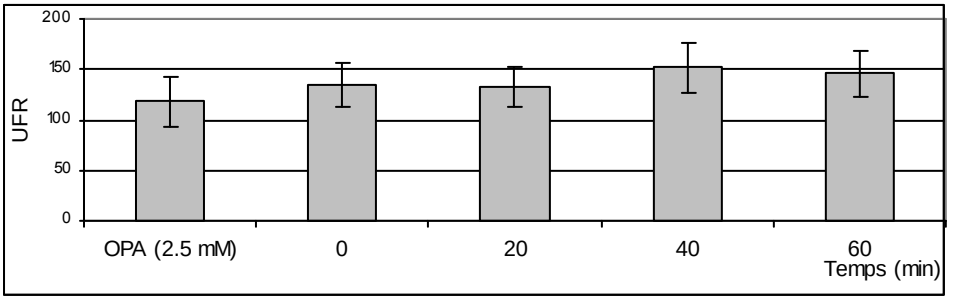


Figure 34. *Stabilité de l'O-phthalaldehyde.* Moyenne+/- Ecartype.

a.5. Temps d'incubation

Nous avons mesuré les cinétiques de dégradation de l'hème dépendante du GSH pendant 60 min avec lectures toutes les 20 min. (Figure 35).

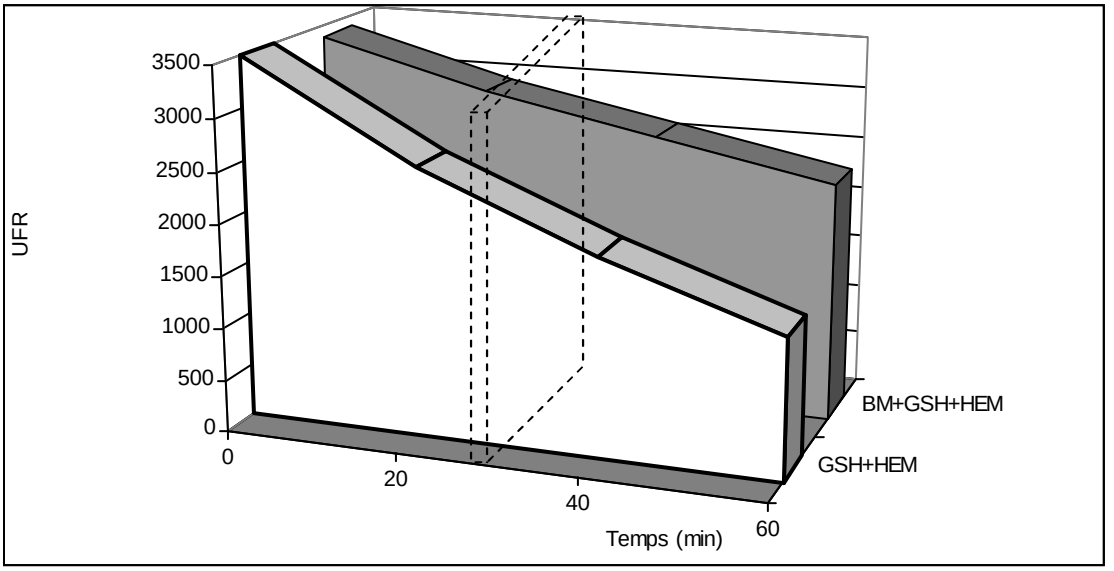


Figure 35. *Cinétiques de dégradation de l'hème dépendante de GSH.* Moyenne.

a.6. Température d'incubation

Afin d'évaluer si l'essai est robuste face à la température, nous avons fait l'essai avec des incubations à température ambiante (18 +/- 2 °C) et à 37 °C, pour: le BM, la CQ, la Q, l'ATO et la PRI; (Figure 36).

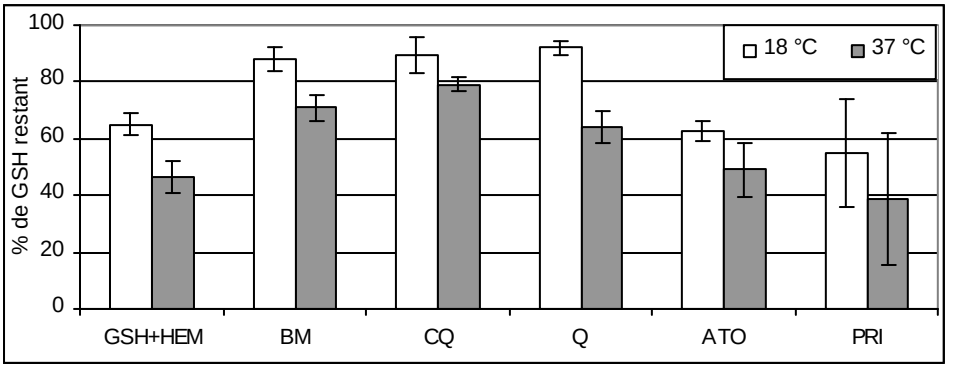


Figure 36. *Comparaisons des % GSH restant en 30 min à différentes températures d'incubation.*

a.7. Effet de solvant (méthanol)

Le méthanol a été employé comme solvant pour certaines drogues (Figure 37).

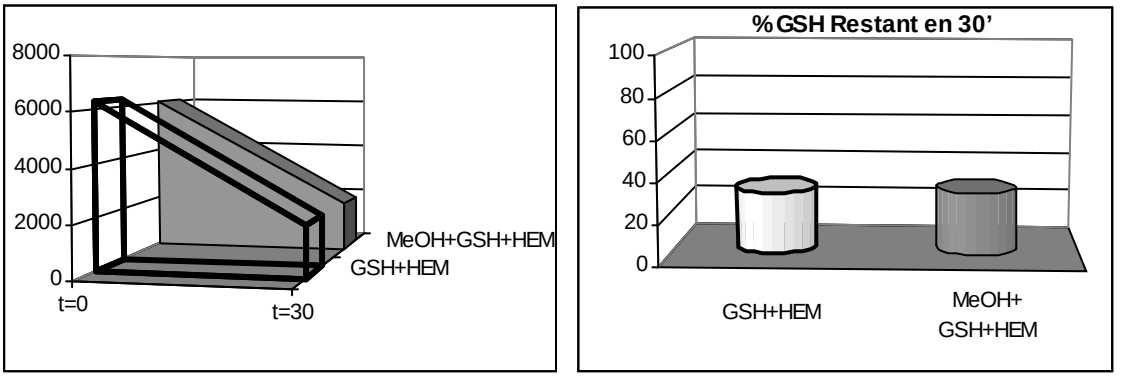


Figure 37. *Influence du méthanol sur la dégradation du GSH et Pourcentage de GSH restant en 30 min.*

b. Test des drogues sur l'interaction hème/glutathion

b.1. Amodiaquine

La Figure 38 présente les résultats généraux de fluorescence des différentes espèces étudiées. Les valeurs les plus élevées ont été obtenues avec le GSH, à environ 12000 UFR. Il est important de souligner les valeurs basses d'UFR produites par l'AMO.

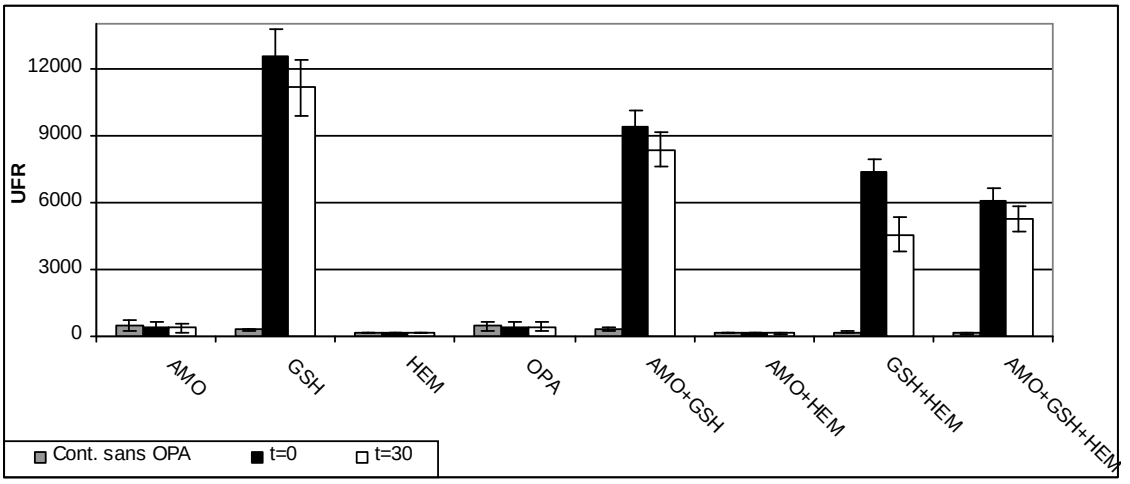


Figure 38. *Influence de l'AMO sur la transformation du GSH.* Moyenne+/- Ecartype.

<u>Contrôle GSH pour l'AMO</u>

Le GSH ne présente pas de fluorescence importante avant l'addition de l'OPA. Avec l'addition de l'OPA, la fluorescence augmente de façon significative à t=0 min, puis il y a une petite diminution à t=30 min qui démontre une petite décomposition qui sera commentée par la suite dans la discussion (Figure 38). Les valeurs de l'UFR de

la drogue avec le GSH (AMO+GSH) sont significativement inférieures par rapport à celles du GSH seule à t=0 min et à t=30 min.

Contrôle hème pour l'AMO

La fluorescence de l'hème ne varie pas significativement par rapport à l'échantillon drogue-hème.

Contrôle OPA pour l'AMO

La fluorescence de la drogue n'augmente pas en ajoutant l'OPA, car dans les conditions de l'essai, il n'y a probablement pas d'interaction drogue-OPA. De plus, les valeurs de fluorescence de la drogue sont minimales et l'échantillon drogue-OPA ne présente pas une fluorescence significative (Figure 38).

Influence de l'AMO sur la dégradation du GSH

La fluorescence à t=0 avec AMO+GSH+HEM est inférieure à celle obtenue avec le contrôle GSH+HEM. La Figure 39 présente un taux de diminution de la fluorescence plus grand pour le contrôle (GSH+HEM) par rapport à l'échantillon (AMO+GSH+HEM).

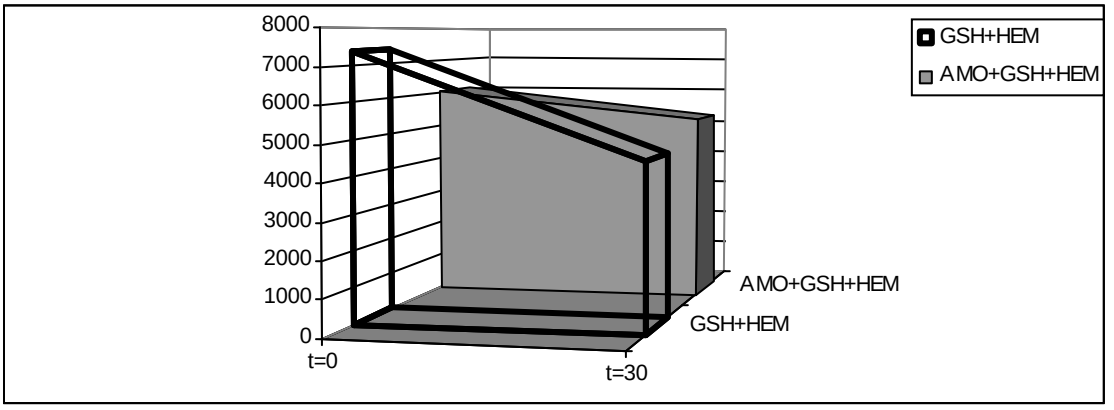


Figure 39. *Influence de l'AMO sur la dégradation du GSH en 30 min.*

Le pourcentage de GSH restant, démontre un taux inférieur de dégradation quand l'AMO est présente (Figure 40).

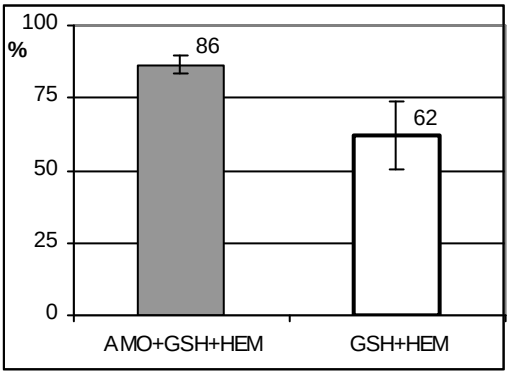


Figure 40. *Pourcentage de GSH restant en 30 min.* Moyenne+/- Ecartype.

b.2. Artemether

Les résultats généraux de fluorescence des différentes espèces étudiées sont présentés dans la Figure 41; les plus fortes valeurs ont été obtenues avec le GSH et ART+GSH, à environ 12000 UFR. Il est important de souligner les faibles valeurs d'UFR produites par la drogue l'ART.

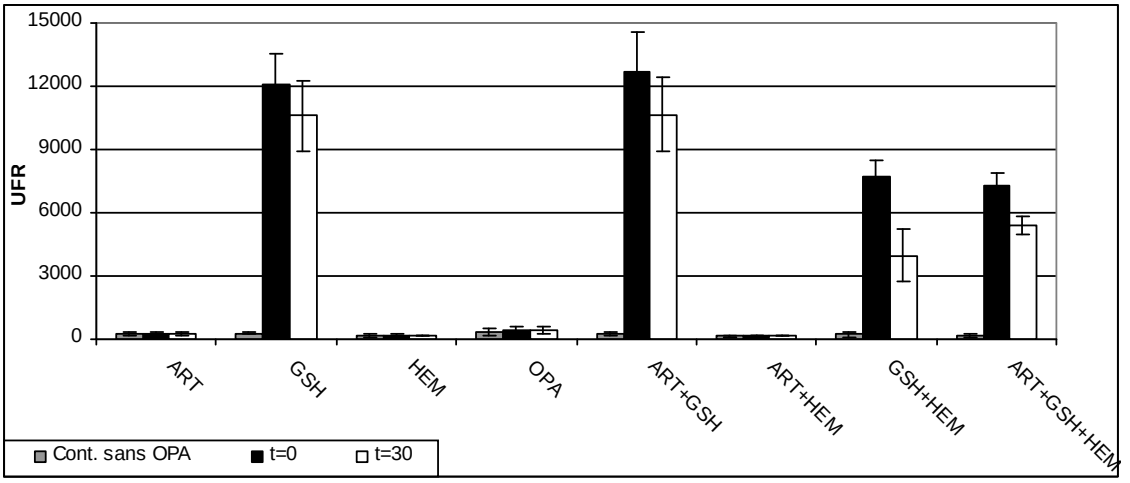


Figure 41. *Influence d'ART sur la transformation du GSH.* Moyenne+/- Ecartype.

<u>Contrôle GSH pour l'ART</u>

Il n'y a pas de différences significatives entre les valeurs de l'UFR de la drogue avec le GSH (ART+GSH) par rapport au GSH seul, tant à t=0 min comme à t=30 min. Cela suggère qu'il n'existe pas d'interaction importante qui affecte le résultat de l'essai. (Figure 41).

Contrôle hème pour l'ART

La fluorescence de l'hème ne varie pas significativement par rapport à l'échantillon drogue-hème donc il n'existe pas d'interaction importante qui affecte le résultat de l'essai (Figure 41).

Contrôle OPA pour l'ART

La fluorescence de la drogue n'augmente pas de façon significative en ajoutant l'OPA, car dans des conditions de l'essai il n'y a probablement pas d'interaction drogue-OPA. De plus, les valeurs de fluorescence de la drogue sont minimales et l'échantillon drogue-OPA ne présente pas une fluorescence significative (Figure 41).

Influence de l'ART sur la dégradation du GSH

La Figure 42 présente un taux de diminution de la fluorescence plus grand pour le contrôle (GSH+HEM) par rapport à l'échantillon (ART+GSH+HEM). Le pourcentage de GSH restant montre un taux inférieur de dégradation quand l'ART est présente.

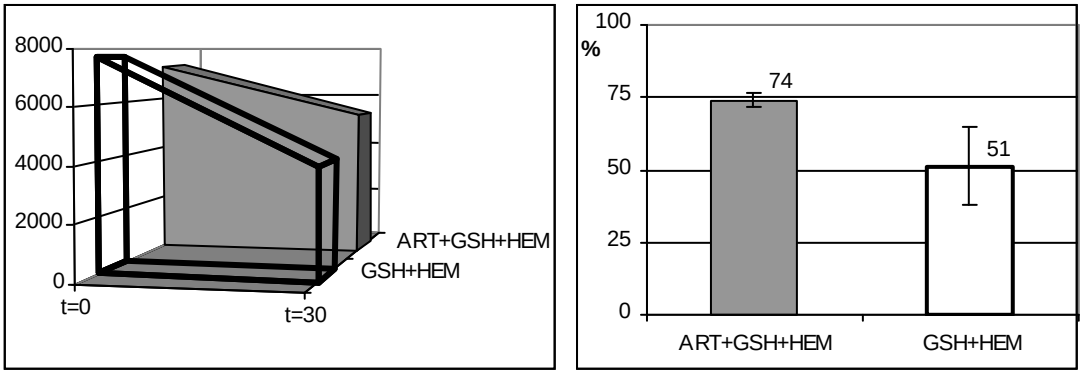


Figure 42. *Influence de l'ART sur la dégradation du GSH et Pourcentage de GSH restant en 30 min.* Moyenne+/- Ecartype.

b.3. Atovaquone

Les résultats généraux de fluorescence des différentes espèces étudiées sont présentés dans la Figure 43; pour le GSH, l'HEM et l'OPA les données correspondent à un seul essai. Les plus hautes valeurs ont été obtenues avec le GSH et l'ATO+GSH, à environ 11000 UFR. Il est important de souligner les faibles valeurs d'UFR produites par l'ATO.

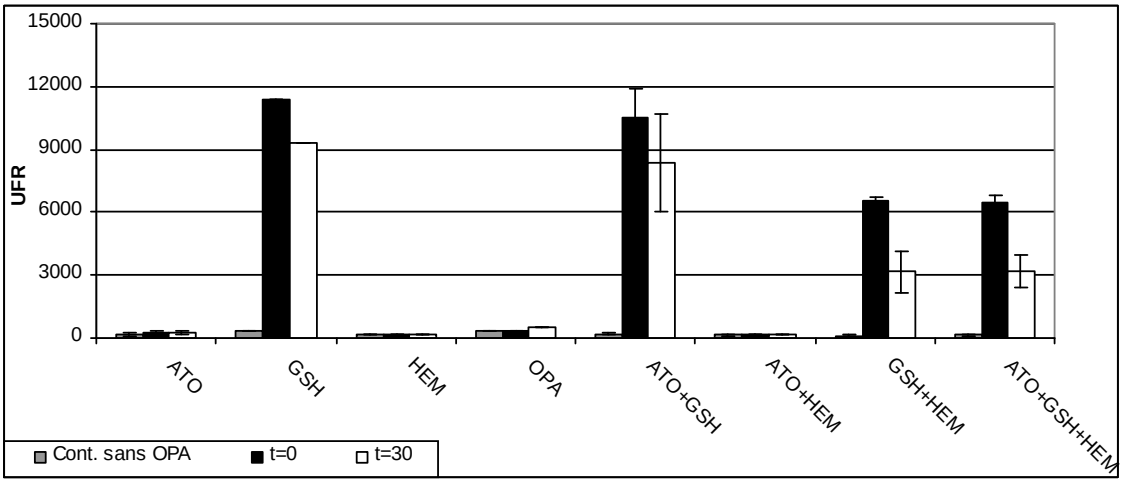


Figure 43. *Influence de l'ATO sur la transformation du GSH.* Moyenne+/- Ecartype (GSH, HEM et OPA une seule donnée).

Contrôle GSH pour l'ATO

Il n'y a pas de différences importantes entre les valeurs UFR de la drogue avec le GSH (ATO+GSH) par rapport au GSH seul tant à t=0 min comme à t=30 min suggérant qu'il n'existe pas d'interaction importante qui affecte le résultat de l'essai (Figure 43).

Contrôle hème pour l'ATO

La fluorescence de l'hème ne varie pas significativement par rapport à l'échantillon drogue-hème donc il n'existe pas d'interaction importante qui affecte le résultat de l'essai (Figure 43).

Contrôle OPA pour l'ATO

La fluorescence de la drogue n'augmente pas de façon significative en ajoutant l'OPA, car dans les conditions de l'essai, il n'y a pas d'interaction drogue-OPA. Par ailleurs, les valeurs de fluorescence de la drogue sont minimales et l'échantillon drogue-OPA ne présente pas une fluorescence significative (Figure 43).

Influence de l'ATO sur la dégradation du GSH

La Figure 44 présente un taux de diminution de la fluorescence similaire pour le contrôle (GSH+HEM) et l'échantillon (ATO+GSH+HEM). Les pourcentages de GSH restant après 30 min ne sont significativement pas différents.

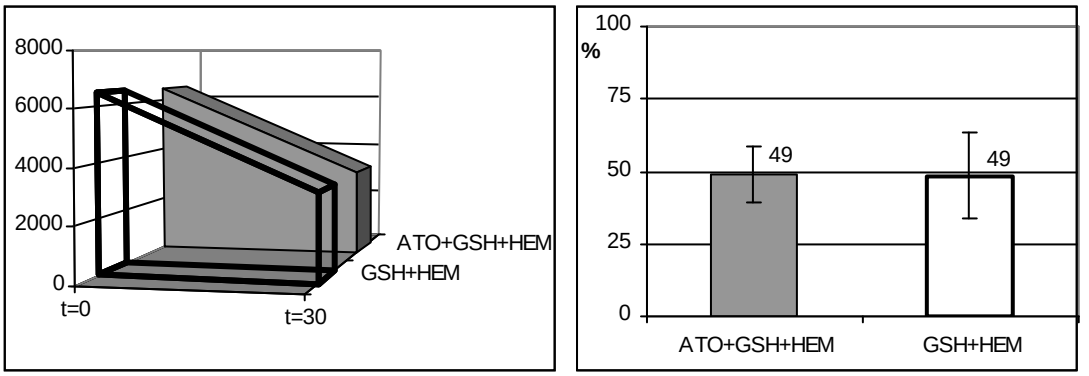


Figure 44. *Influence de l'ATO sur la dégradation du GSH et Pourcentage de GSH restant en 30 min.* Moyenne+/- Ecartype.

b.4. Bleu de méthylène

Les résultats généraux de fluorescence des différentes espèces étudiées sont présentés dans la Figure 45; les plus hautes valeurs ont été obtenues avec le GSH et BM+GSH, à environ 12000 UFR. Il est important de souligner les faibles valeurs d'UFR produites par le BM.

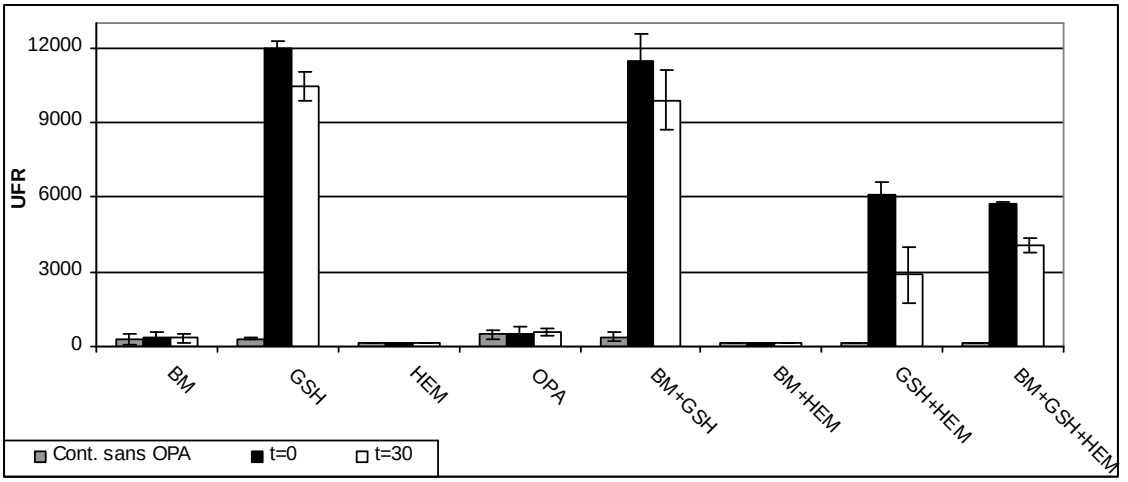


Figure 45. *Influence de BM sur la transformation du GSH.* Moyenne+/- Ecartype.

<u>Contrôle GSH pour le BM</u>

Les valeurs d'UFR de la drogue avec GSH (BM+GSH) par rapport au GSH seul, à t=0 min et à t=30 min, ne présentent pas de différences significatives, suggérant qu'il n'existe pas d'interaction importante qui affecte le résultat de l'essai (Figure 45).

Contrôle hème pour le BM

La fluorescence de l'hème ne varie pas significativement par rapport à l'échantillon drogue-hème donc il n'existe pas d'interaction importante qui affecte le résultat de l'essai, bien qu'il y ait une importante variabilité dans les valeurs UFR de BM, mais ces valeurs sont faibles et n'affectent pas le résultat de l'essai Figure 45.

Contrôle OPA pour le BM

La fluorescence de la drogue n'augmente pas de façon significative en ajoutant l'OPA, car dans des conditions de l'essai il n'a pas d'interaction drogue-OPA. De plus, les valeurs de fluorescence de la drogue sont minimales et l'échantillon drogue-OPA ne présente pas une fluorescence significative (Figure 45).

Influence de le BM sur la dégradation du GSH

La Figure 46 présente une plus grande diminution de la fluorescence pour le contrôle (GSH+HEM) que pour l'échantillon (BM+GSH+HEM). Le pourcentage de GSH restant montre un taux inférieur de dégradation quand le BM est présent.

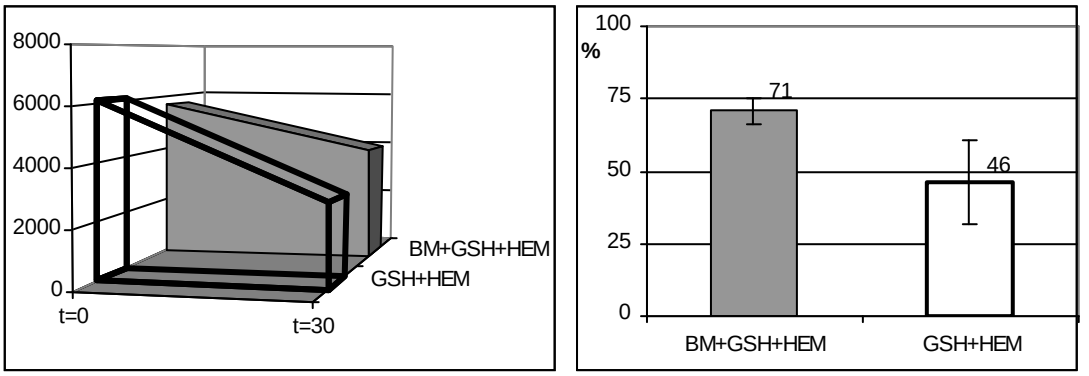


Figure 46. *Influence du BM sur la dégradation du GSH et Pourcentage de GSH restant en 30 min.* Moyenne+/- Ecartype.

b.5. Chloroquine

La Figure 47 présente les résultats généraux de fluorescence des différentes associations étudiées; les plus hautes valeurs ont été obtenues avec le GSH et CQ+GSH, autour de 10000 UFR.

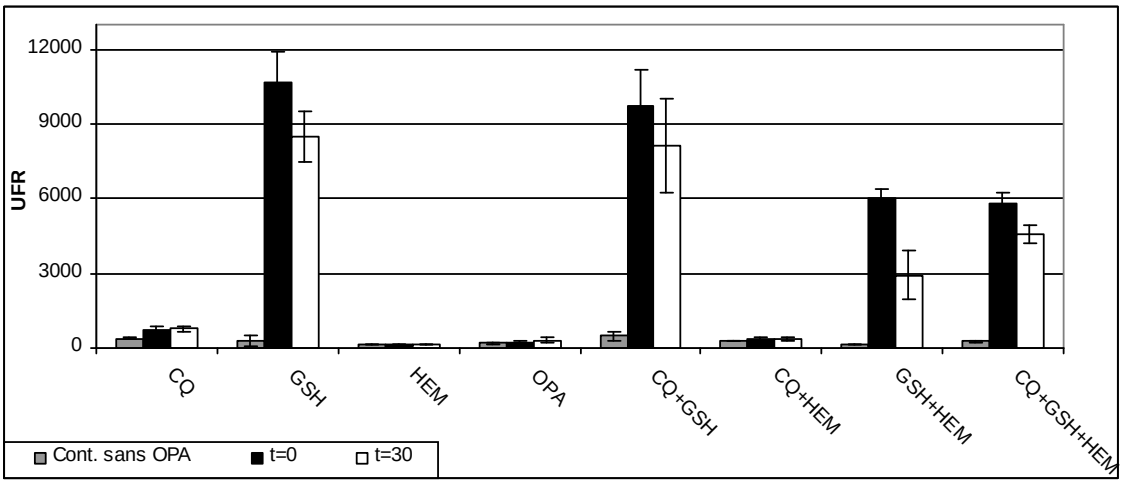


Figure 47. *Influence de la CQ sur la transformation du GSH.* Moyenne+/- Ecartype.

Contrôle GSH pour la CQ

Les valeurs de l'UFR de la drogue avec le GSH (CQ+GSH) par rapport au GSH seul, tant à t=0 min comme à t=30 min, ne présentent pas de différences significatives suggérant qu'il n'existe pas d'interaction importante qui affecte le résultat de l'essai (Figure 47).

Contrôle hème pour la CQ

Il y a une différence significative entre la fluorescence de l'hème et celle de l'échantillon drogue-hème (Figure 48).

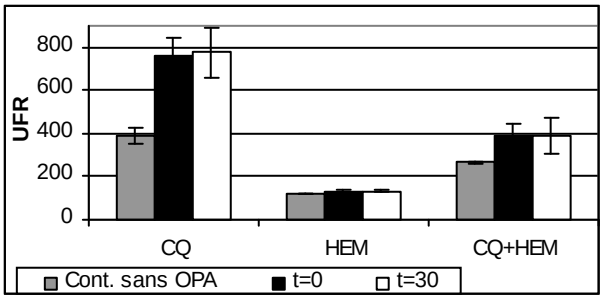


Figure 48. *Contrôle hème dans l'Influence de la CQ sur la transformation du GSH.* Moyenne+/- Ecartype.

Contrôle OPA pour la CQ

La fluorescence de la drogue augmente de façon significative en ajoutant l'OPA (Figure 47).

Influence de la CQ sur la dégradation du GSH

La Figure 49 présente une plus grande diminution de fluorescence pour le contrôle (GSH+HEM) que pour l'échantillon (CQ+GSH+HEM). Le pourcentage de GSH restant montre un taux inférieur de dégradation quand la CQ est présente.

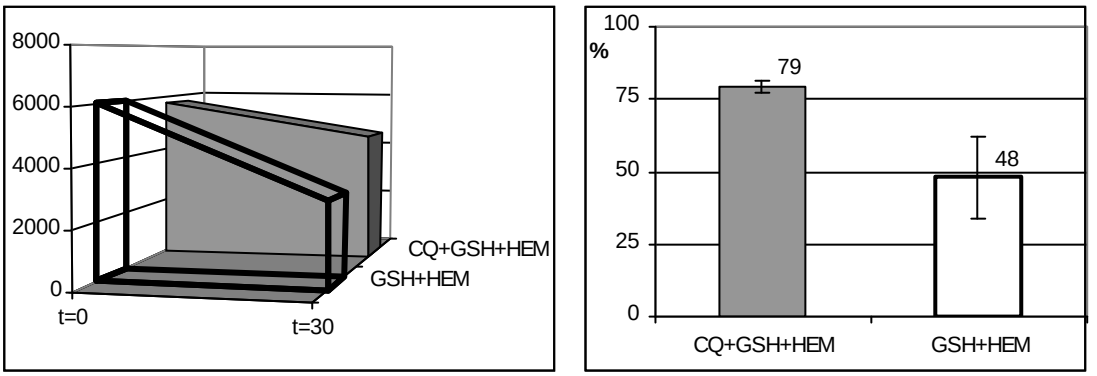


Figure 49. *Influence de la CQ sur la dégradation du GSH et Pourcentage de GSH restant en 30 min.* Moyenne+/- Ecartype.

b.6. Doxycycline

La Figure 50 présente les résultats généraux de fluorescence des différentes drogues étudiées; les valeurs les plus élevées ont été obtenues avec le GSH autour de 10000 UFR. Il faut souligner l'importante variabilité des données obtenues dans les trois essais présentés.

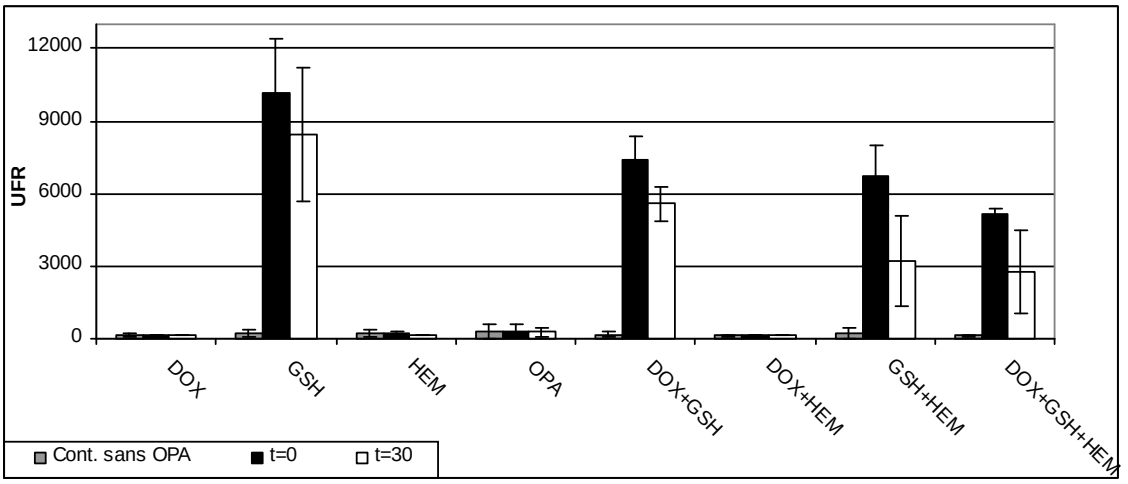


Figure 50. *Influence de la DOX sur la transformation du GSH.* Moyenne+/- Ecartype.

Contrôle GSH pour la DOX

Les valeurs d'UFR de la drogue avec le GSH (DOX+GSH) sont inférieures par rapport au GSH tout seul, que ce soit à t=0 min ou à t=30 min (Figure 50).

Contrôle hème pour la DOX

La fluorescence de l'hème par rapport à l'échantillon drogue-hème ne présente pas de variations significatives; apparemment il n'existe pas d'interaction (Figure 50).

Contrôle OPA pour la DOX

La fluorescence de la drogue n'augmente pas de façon significative en ajoutant l'OPA, car dans ces conditions de l'essai il n'y a pas d'interaction drogue-OPA. Par ailleurs, les valeurs de fluorescence de la drogue sont minimales et l'échantillon drogue-OPA ne présente pas de fluorescence significative (Figure 50).

Influence de la DOX sur la dégradation du GSH

La Figure 51 présente une diminution de fluorescence similaire pour le contrôle (GSH+HEM) par rapport à l'échantillon (DOX+GSH+HEM). Le pourcentage de GSH restant montre qu'il n'existe pas de différence significative.

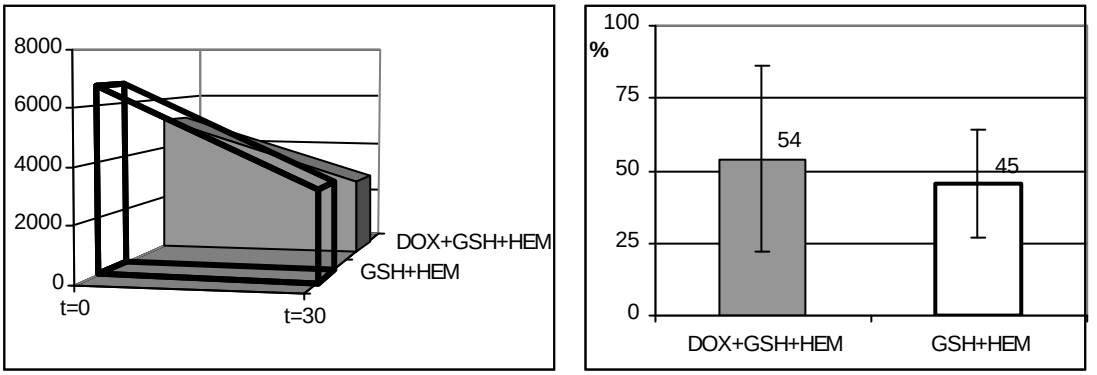


Figure 51. *Influence de la DOX sur la dégradation du GSH et Pourcentage de GSH restant en 30 min.* Moyenne+/- Ecartype.

b.7. Mefloquine

La Figure 52 présente les résultats généraux de fluorescence des différentes associations étudiées; les valeurs les plus élevées ont été obtenues avec le GSH et

MEF+GSH, autour de 10000 UFR. Il faut souligner la variabilité des données obtenues dans les trois essais présentés.

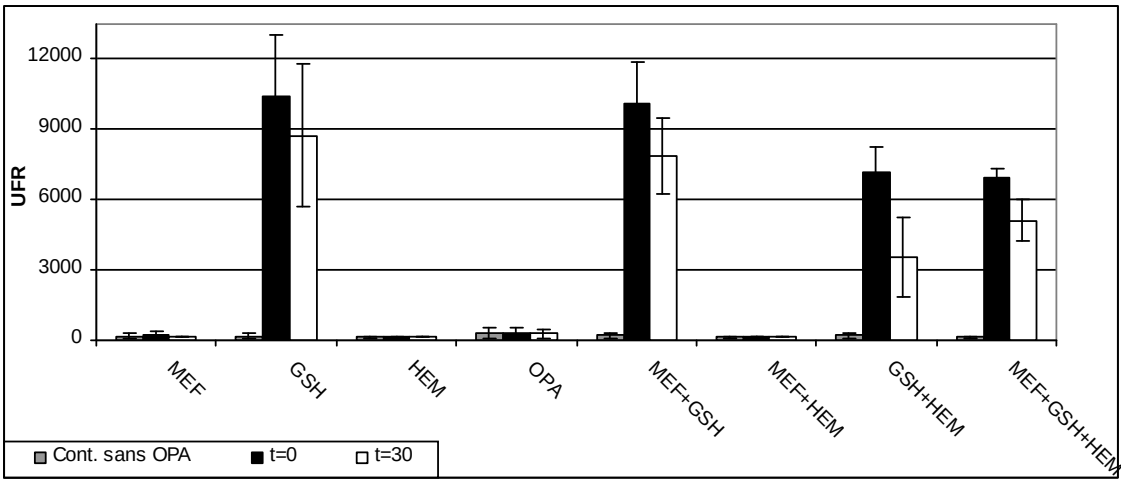


Figure 52. *Influence de MEF sur la transformation du GSH.* Moyenne+/- Ecartype.

Contrôle GSH pour la MEF

Les valeurs d'UFR de la drogue avec le GSH (MEF+GSH) par rapport au GSH seul, à t=0 min comme à t=30 min, ne présentent pas de différences significatives (Figure 52).

Contrôle hème pour la MEF

La fluorescence de l'hème par rapport à l'échantillon drogue-hème ne présente pas de variations significatives; il n'existe pas d'interaction (Figure 52).

Contrôle OPA pour la MEF

La fluorescence de la drogue n'augmente pas en ajoutant l'OPA, car dans les conditions de l'essai il n'y a pas d'interaction drogue-OPA (Figure 52).

Influence de la MEF sur la dégradation du GSH

La Figure 53 présente une diminution de la fluorescence plus grande pour le contrôle (GSH+HEM) que pour l'échantillon (MEF+GSH+HEM). Le pourcentage de GSH restant montre cette diminution de dégradation.

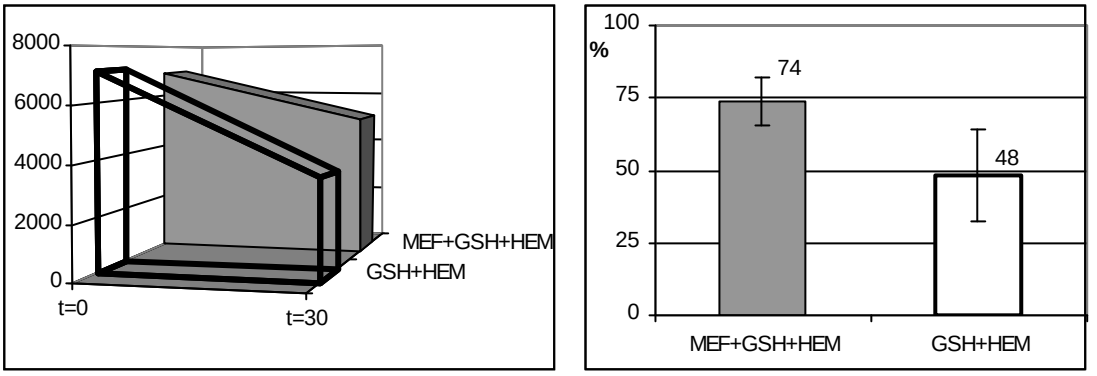


Figure 53. *Influence de la MEF sur la dégradation du GSH et Pourcentage de GSH restant en 30 min.* Moyenne+/- Ecartype.

b.8. Primaquine

La Figure 54 présente les résultats généraux de fluorescence des différentes associations étudiées; les valeurs les plus élevées ont été obtenues avec le GSH autour de 10000 UFR. Il faut souligner l'importante variabilité des données obtenues dans les trois essais présentés.

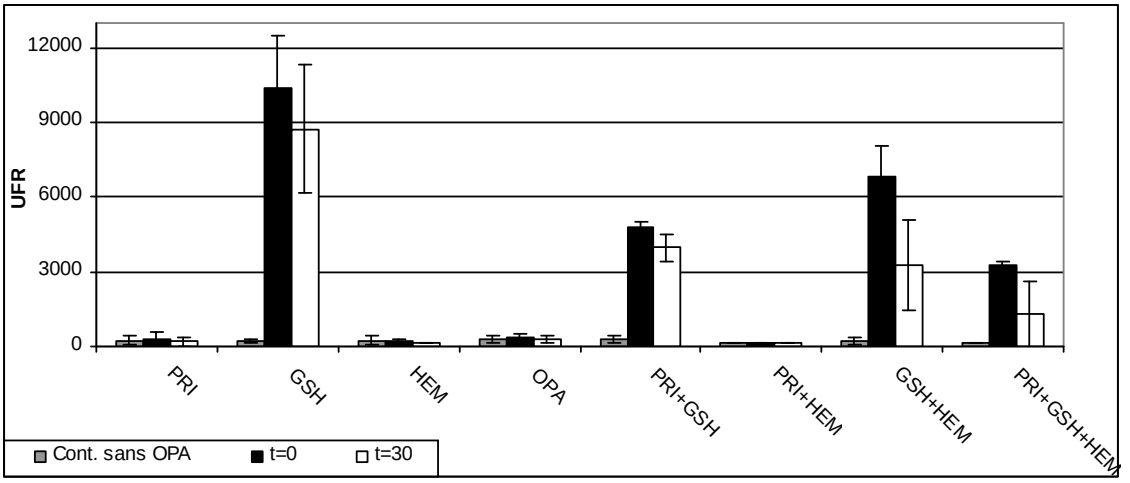


Figure 54. *Influence de la PRI sur la transformation du GSH.* Moyenne+/- Ecartype.

<u>Contrôle GSH pour la PRI</u>

Les valeurs d'UFR de la drogue avec le GSH (PRI+GSH) sont significativement inférieures en comparaison au GSH seul, tant à t=0 min comme à t=30 min (Figure 54).

Contrôle hème pour la PRI

La fluorescence de l'hème par rapport à l'échantillon drogue-hème ne présente pas de variations importantes; il n'existe pas d'interaction (Figure 54).

Contrôle OPA pour la PRI

La fluorescence de la drogue n'augmente pas en ajoutant l'OPA, il n'y a pas d'interaction drogue-OPA (Figure 54).

Influence de la PRI sur la dégradation du GSH

La Figure 55 présente les valeurs obtenues avec le contrôle (GSH+HEM) qui sont significativement supérieures à celles obtenues avec l'échantillon (PRI+GSH+HEM), tant à t=0 min comme à t=30 min, démontrant une importante interaction.

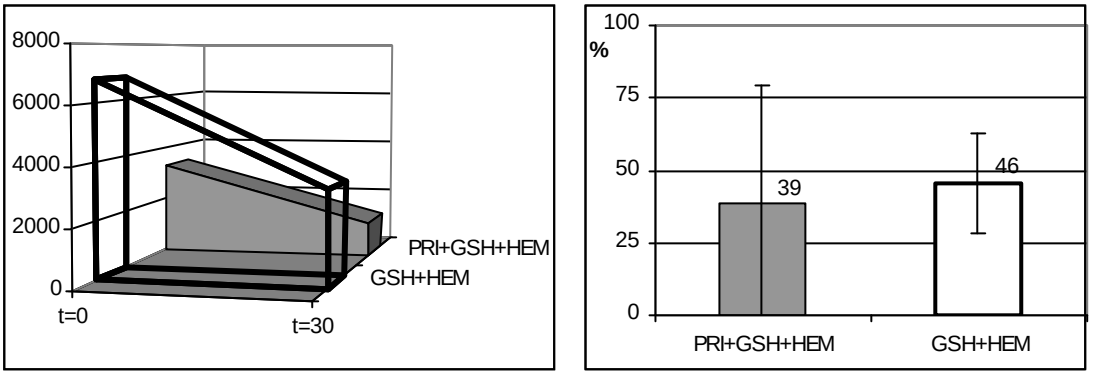


Figure 55. *Influence de la PRI sur la dégradation du GSH et Pourcentage de GSH restant au bout de 30 min.* Moyenne+/- Ecartype.

b.9. Pyrimethamine

La Figure 56 présente les résultats généraux de fluorescence des différentes associations étudiées; les plus hautes valeurs ont été obtenues avec le GSH autour de 10000 UFR. Il faut souligner la haute variabilité des données obtenues dans les trois essais présentés.

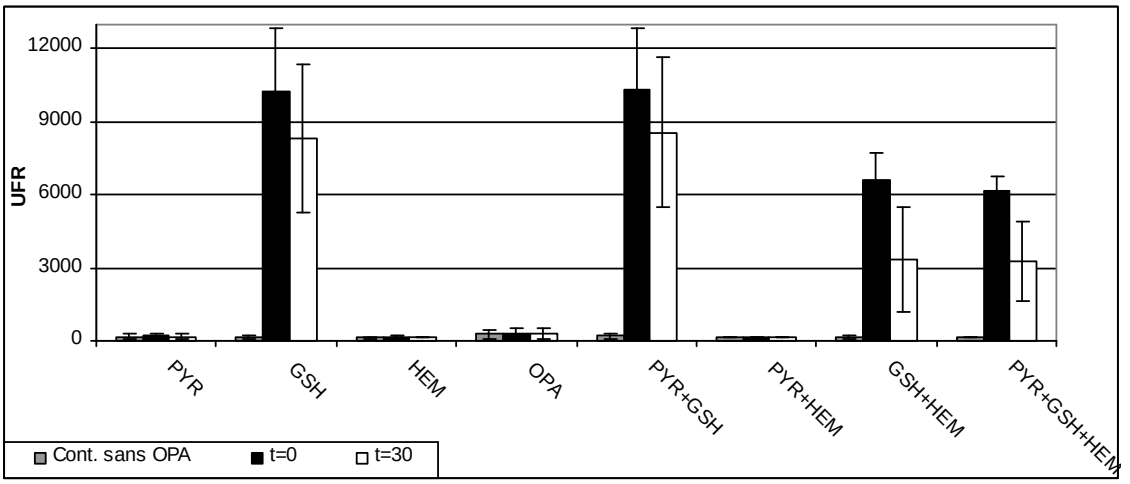


Figure 56. *Influence de la PYR sur la transformation du GSH.* Moyenne+/- Ecartype.

Contrôle GSH pour la PYR

Les valeurs d'UFR de la drogue avec le GSH (PYR+GSH) ne sont pas significativement inférieures face au GSH seul, tant à t=0 min comme à t=30 min, signant qu'il n'y a pas d'interaction de GSH avec la drogue (Figure 56).

Contrôle hème pour la PYR

La fluorescence de l'hème par rapport à l'échantillon drogue-hème ne présente pas de variations importantes; il n'existe pas d'interaction (Figure 56).

Contrôle OPA pour la PYR

La fluorescence de la drogue n'augmente pas en ajoutant l'OPA, car dans ces conditions de l'essai il n'y a pas d'interaction drogue-OPA (Figure 56).

Influence de la PYR sur la dégradation du GSH

La Figure 57 présente une diminution de la fluorescence similaire pour le contrôle (GSH+HEM) et l'échantillon (PYR+GSH+HEM). Aussi les pourcentages de GSH restant après 30 min ne sont pas significativement différents.

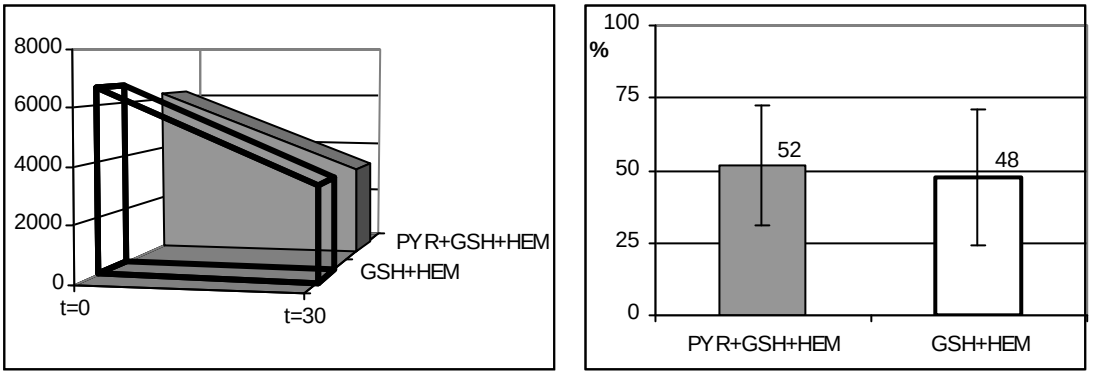


Figure 57. *Influence de la PYR sur la dégradation du GSH et Pourcentage de GSH restant au bout de 30 min.* Moyenne+/- Ecartype.

b.10. Quinine

La Figure 58 présente les résultats généraux de fluorescence des différentes espèces étudiées; les valeurs les plus élevées ont été obtenues avec le GSH et Q+GSH, autour de 11000 UFR.

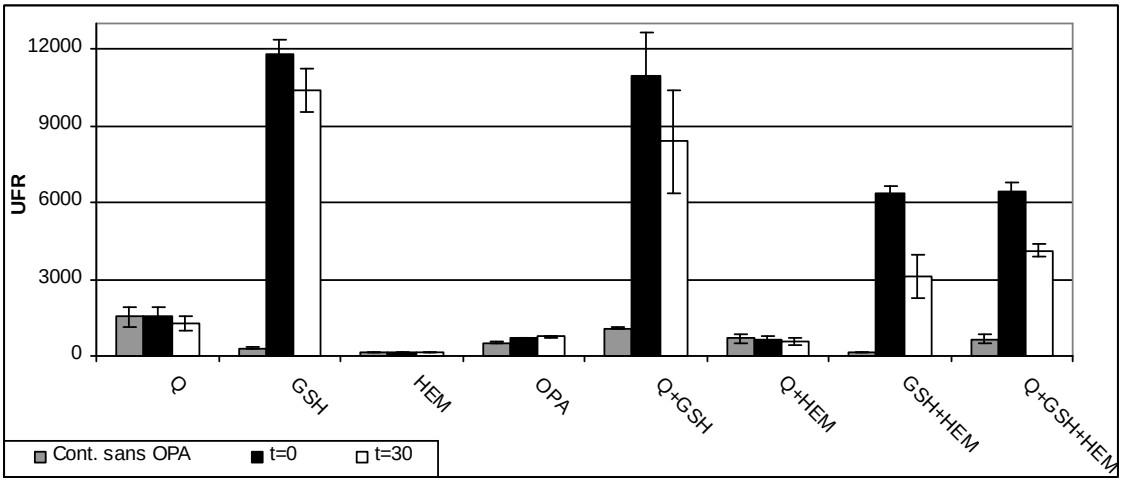


Figure 58. *Influence de la Q sur la transformation du GSH.* Moyenne+/- Ecartype.

<u>Contrôle GSH pour la Q</u>

Les valeurs d'UFR de la drogue avec le GSH (Q+GSH) par rapport au GSH seul, tant à t=0 min comme à t=30 min, présentent des petites différences (non significatives) (Figure 58).

Contrôle hème pour la Q

Il y a une variation significative entre la fluorescence de l'hème par rapport à l'échantillon drogue-hème (Figure 59).

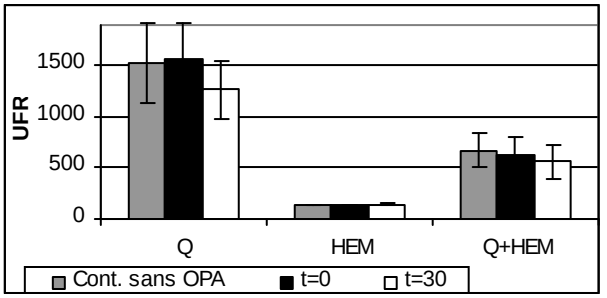


Figure 59. *Contrôle hème dans l'étude de l'Influence de la Q sur la transformation du GSH.* Moyenne+/- Ecartype.

Contrôle OPA pour la Q

La fluorescence de la drogue n'augmente pas de façon significative en ajoutant l'OPA (Figure 58).

Influence de la Q sur la dégradation du GSH

La Figure 60 présente une diminution de la fluorescence plus grande pour le contrôle (GSH+HEM) par rapport à l'échantillon (Q+GSH+HEM). Le pourcentage de GSH restant montre un taux inférieur de dégradation quand la Q est présente.

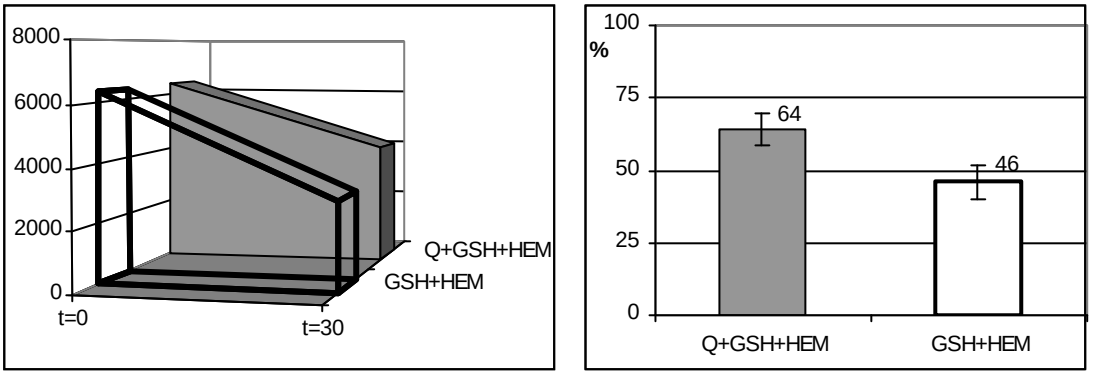


Figure 60. *Influence de la Q sur la dégradation du GSH et Pourcentage de GSH restant en 30 min.* Moyenne+/- Ecartype.

6.2. Les interactions physico-chimiques drogue-hème

a. Essai de fixation à hémozoïne par spectrophotométrie UV VIS

L'absorbance de la solution d'hème seule à 10 µM (Témoin hème) à 400 nm est 0,633 et ne change pas de façon importante après le mélange avec des concentrations de BM entre 1,5 et 31,3 µM (Figure 61).

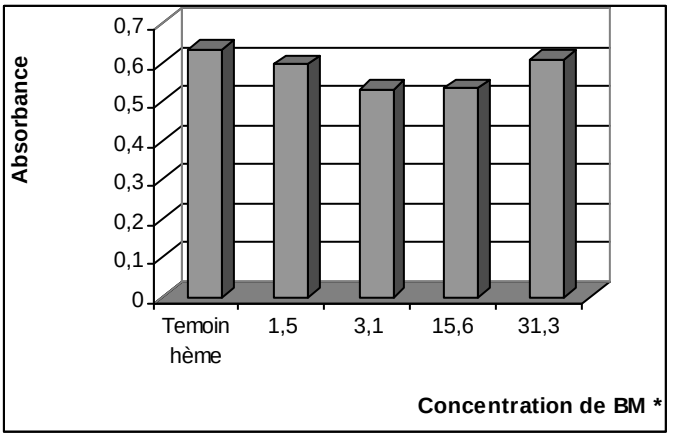


Figure 61. *Absorbance des mélanges hème–BM à 400 nm.* * µM.

À la longueur d'onde correspondant à la plus haute absorption du BM, nous observons que l'absorbance et la concentration sont directement proportionnelles (Figure 62).

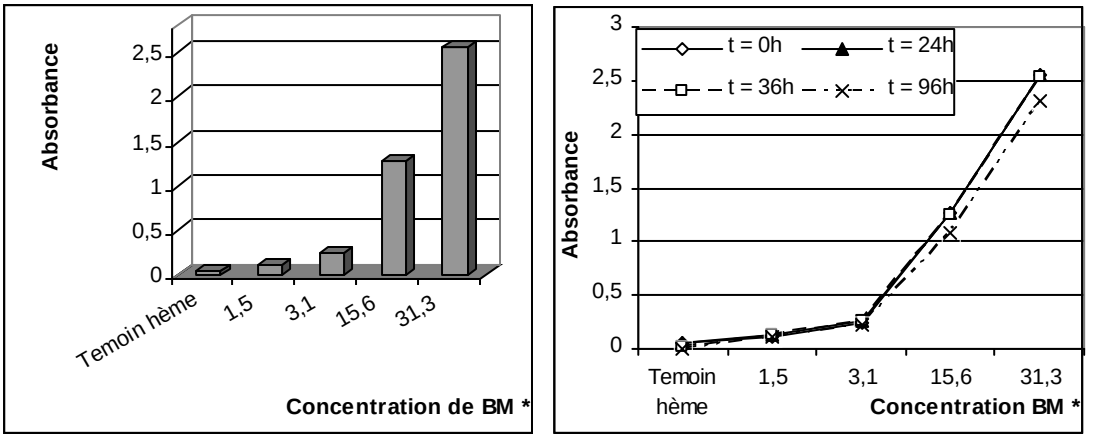


Figure 62. *Absorbance des mélanges hème–BM à 665 nm et à des différents temps d'incubation.* * µM.

b. Essai de fixation à hémozoïne par chromatographie sur couches minces CCM

La tâche correspondant à la migration de l'hème seule à 10 µM (Témoin hème) a une distance de migration très semblable à celle obtenue avec des solutions qui contiennent BM+hème (Figures 63 – 65).

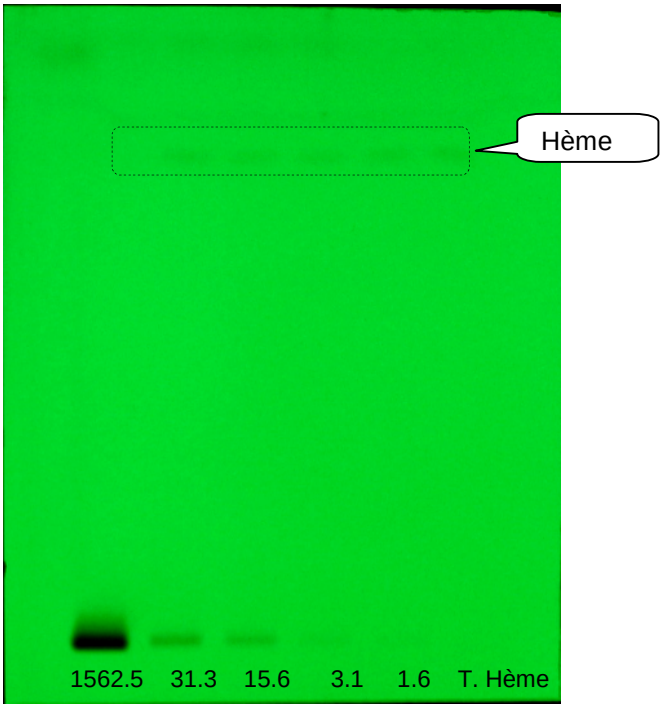


Figure 63. *Chromatographie sur couches minces des mélanges hème–BM lu à 254 nm*. Concentrations (µM).

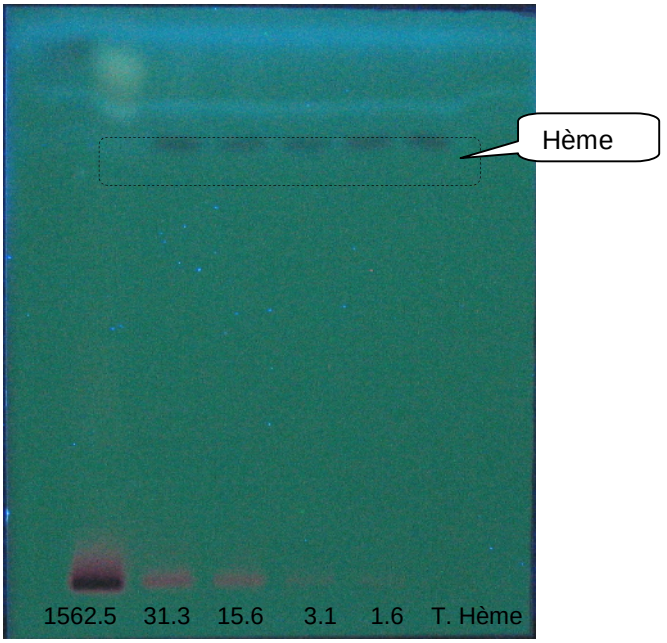


Figure 64. *Chromatographie sur couches minces des mélanges hème–BM lu à 365 nm.* Concentrations (µM).

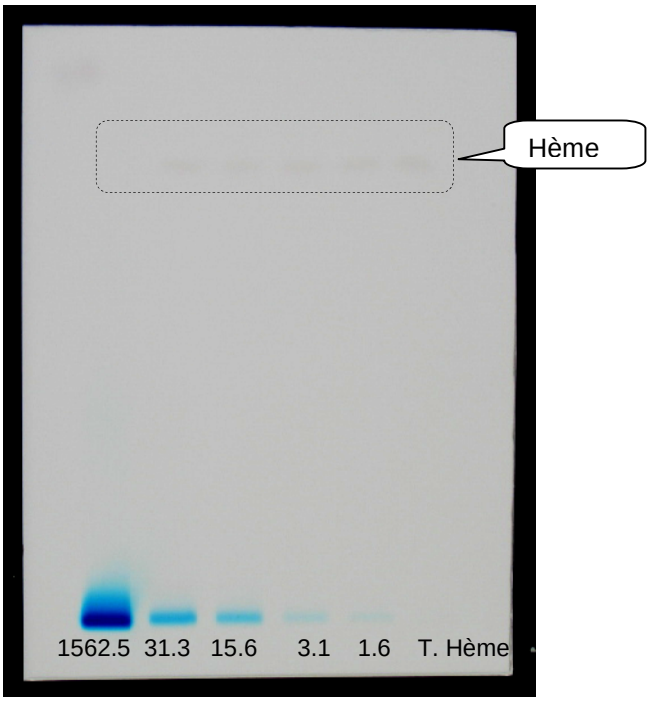


Figure 65. *Chromatographie sur couches minces des mélanges hème–BM lu dans le visible.* Concentrations (µM).

c. Essai de fixation à hémozoïne par spectrométrie de masses

Les conditions de l'essai ont été adaptées de Pashynska (2004). Les Figures 66 et 67 présentent le spectre de masse ESI obtenu avec le mélange BM-hème (1 :1).

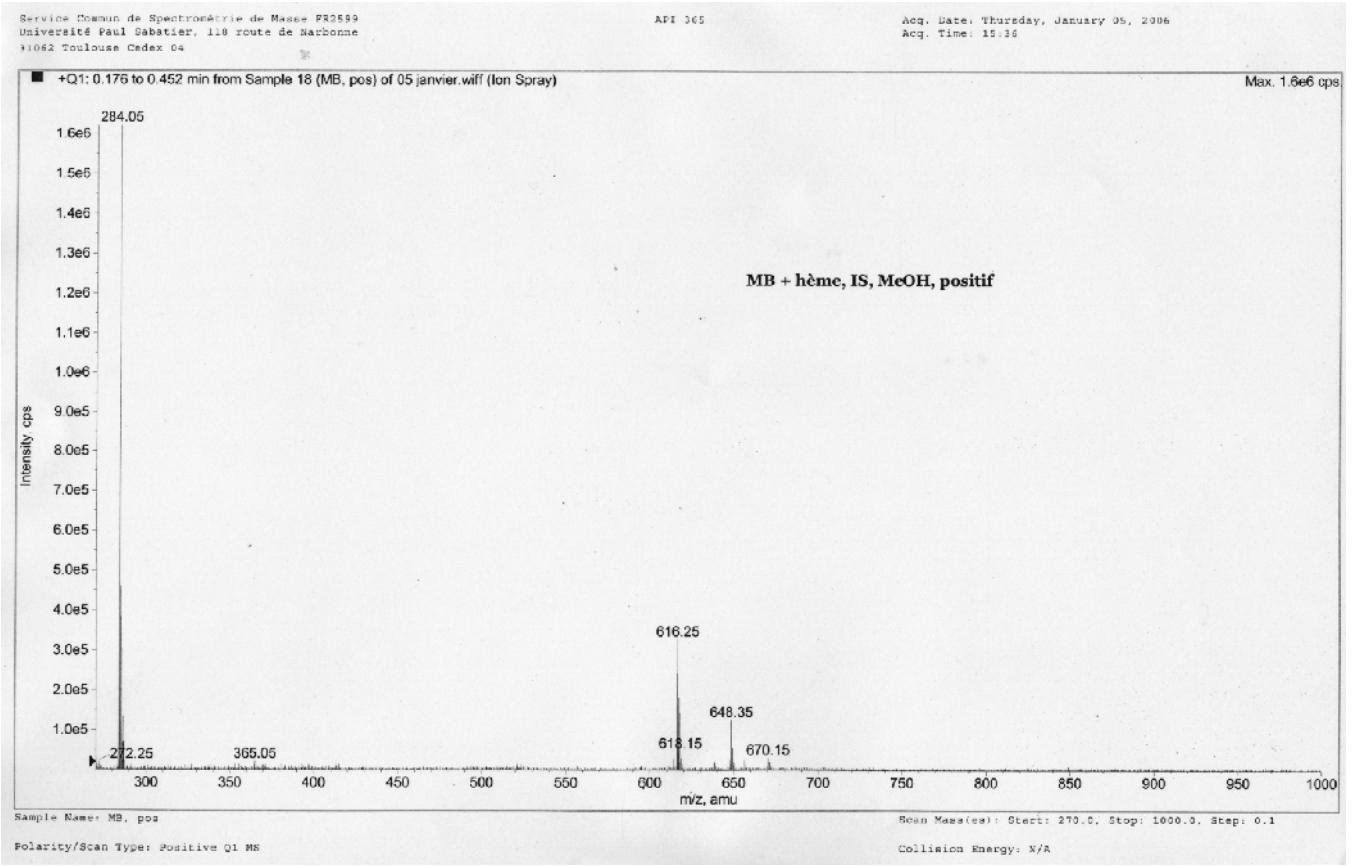


Figure 66. *Spectre de masse du mélange BM-hème (250-1000 m/z).*

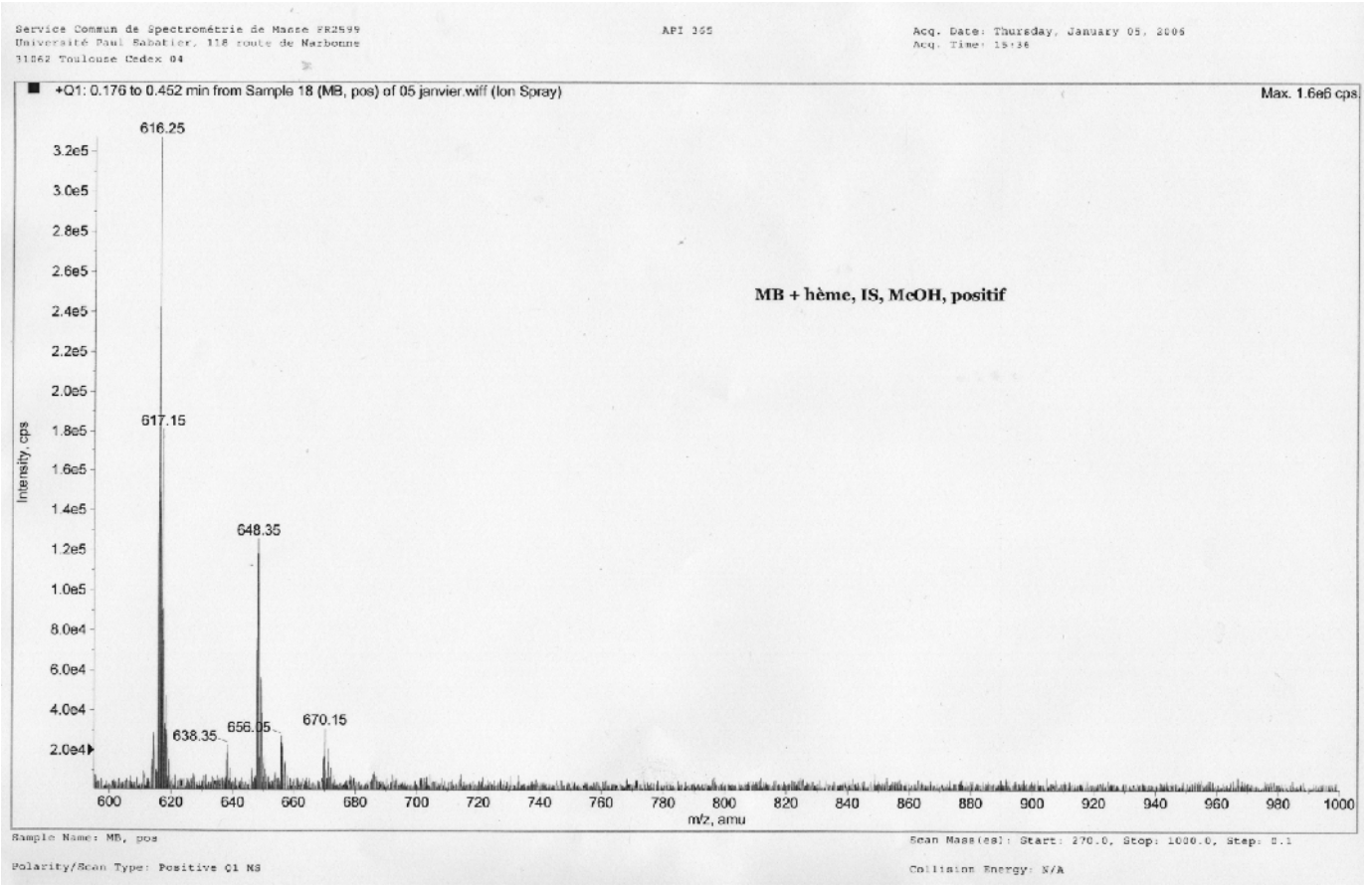


Figure 67. *Spectre de masse du mélange BM-hème (600-1000 m/z).*

IV. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

CHAPITRE 1
ÉVALUATION *IN VITRO* DE L'ACTIVITE ANTIPALUDIQUE SUR LES SOUCHES DE *PLASMODIUM FALCIPARUM*

Ce travail a consisté à évaluer le potentiel antipaludique *in vitro* du bleu de méthylène et à étudier son activité antipaludique sur des souches de *P. falciparum* de différentes origines géographiques et présentant différents niveaux de résistance à la chloroquine. Nous avons également déterminé le stade du développement érythrocytaire sensible au BM et étudié les combinaisons de BM avec des drogues classiquement utilisées en thérapeutique afin de déterminer qu'elle était l'association idéale.

1. DETERMINATION DES PROFILS DE CHIMIOSENSIBILITE DES SOUCHES F32, HB3, FCB1 ET FCM29 DE *P. FALCIPARUM*

Les activités du BM et des autres drogues face aux quatre souches sélectionnées de *P. falciparum* sont présentées dans les Tableaus 7 et 8. La souche F32 a été sensible à l'AMO, ART et CQ; et résistante à l'ATO, DOX, MEF, PYR et Q. La souche HB3 a été sensible à toutes les drogues évaluées (la PRI et la PYR n'ont pas été testées). FcB1 a montré une sensibilité à l'AMO, MEF, PYR et Q mais une résistance à l'ART, ATO, CQ et DOX; finalement la souche FcM29 a été sensible à l'AMO et Q et résistante à toutes les autres drogues.

Comme la souche FcM29 a montré une résistance trois fois supérieure à la FcB1, nous l'avons choisie pour les essais d'interaction avec le BM.

Le BM a été la drogue la plus active sur les quatre souches étudiées, avec des CI_{50} voisines de 5 nM. D'autres auteurs ont montré un degré d'activité semblable, compris entre 1 et 10 nM: Atamna *et al.*, (1996) sur les souches D6 (Sierra Leone, CQ sensible MEF résistant), FCR-3, et W2 (Indochine, CQ, PYR, Q et sulfadoxine résistant), Vennerstrom *et al.*, (1995) sur les souches D6 et W2 (CI_{50} de l'ordre de 4 nM) et récemment Akoachere *et al.*(2005) sur les souches 3D7 (CQ sensible), HB3 (Honduras, CQ sensible), K1 (Su-Est Asie, CQ, résistant) et Dd2 (Indochine, CQ, résistant) avec des CI_{50} entre 3 et 8 nM. Ainsi, comme le BM a une très bonne activité sur des souches provenant d'Afrique, d'Amérique, d'Asie et d'Europe,

spécialement sur des souches chloroquine résistantes, c'est un outil thérapeutique de grande importance dans la lutte contre le paludisme dans le monde.

En ce qui concerne l'indice d'activité par rapport à la chloroquine (IA_{CQ}), le BM est environ 20 fois plus actif que la CQ face à la souche FcB1 et 120 fois plus actif face à FcM29, les deux souches CQ résistantes que nous avons utilisées.

2. DETERMINATION *IN VITRO* DU STADE ERYTHROCYTAIRE DE *PLASMODIUM FALCIPARUM* SENSIBLE AUX COMPOSES

La souche FcB1 a été choisie pour les essais de stade sensible pour son aptitude à générer des « knobs » à la surface de la membrane du GRP qui sont nécessaires pour la technique de synchronisation au Plasmion® (Lelièvre *et al.*, 2005).

2.1. Détermination du stade sensible au bleu de méthylène *in vitro*

L'effet stade-dépendant du BM a été déterminé préliminairement au Centre National de Référence de la Chimiorésistance du Paludisme aux Antilles – Guyane (CNRCP); l'exposition à la drogue a eu lieu à 0, 24 et 28 h (pendant 4 h à chaque fois); avec ce protocole nous avons pu montrer que les stades les plus sensibles de *P. falciparum* au BM se trouvent en début de cycle, (Figure 68).

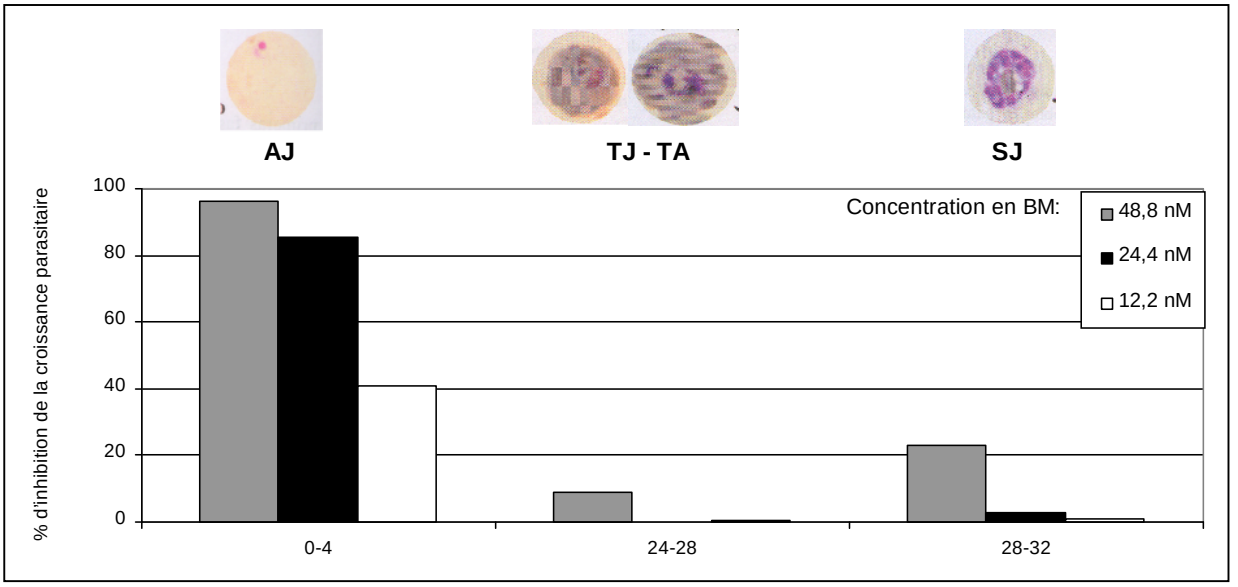


Figure 68. *Essais préliminaires du stade sensible de* P. falciparum *au BM.* AJ = Anneaux Jeunes; TJ = Trophozoïtes Jeunes; TA Trophozoïtes Agés; SJ = Schizontes Jeunes.

Sur le site toulousain de l'UMR 152 UPS-IRD, nous avons confirmé ce résultat au moyen du protocole décrit avec des expositions à la drogue à 0, 8, 16, 24, 32, et 40 h, pendant 8 h à chaque fois.

Les stades anneaux agés et trophozoïtes jeunes ont été les stades les plus sensibles de *P. falciparum* FcB1 vis-à-vis du BM. Les anneaux jeunes ont montré une sensibilité moyenne alors que les trophozoïtes agées, les schizontes et les mérozoïtes ont présenté une faible sensibilité, (Figure 12).

Les CI_{50} obtenus au cours de ces essais montrent les valeurs les plus basses au début du cycle qui augmentent en atteignant des valeurs maximales aux environs de la 40ème heure, ce qui confirme la plus grande activité du BM en début de cycle lorsque les parasites sont au stade anneau – trophozoïte jeune. Ces résultats coïncident avec ceux reportés récemment par Akoachere *et al.* (2005).

Nous avons montré que le BM empêche environ 60 % de la croissance du parasite entre la 8ème et la 24ème heure du cycle érythrocytaire (à environ 6,3 nM) quand la production d'ARN et de protéines plasmodiales est maximale (Arnot, Gull, 1998). Ceci est conforme au fait que l'activité antipaludique du BM dépend des défenses antioxydantes de *Plasmodium*, qui sont entièrement fonctionnelles aux stades anneau agé - trophozoite jeune quand la digestion intensive de l'hémoglobine se produit. Ceci est également corrélé avec la crête de l'expression de la glutathion réductase plasmodiale (réprimée par le BM) commençant 8 heures après l'invasion et atteignant son maximum à la 24ème heure du cycle intra-érythrocytaire (PlasmoDB, 2005).

2.2. Détermination du stade sensible à la quinine *in vitro*

Les essais de stade sensible de *P. falciparum* FcB1 à la Q ont été développés selon le protocole décrit. Les stades les plus sensibles ont été les stades anneaux agés, trophozoïtes jeunes et trophozoïtes agées; les anneaux jeunes ont montré une sensibilité moyenne alors que les schizontes et les mérozoïtes ont présenté une faible sensibilité (Figure 13). Contrairement au BM la Q a présenté une importante activité sur les trophozoïtes agés.

Nos résultats coïncident avec ceux de Ter Kuile *et al.*, (1993) qui ont trouvé que les stades les plus sensibles étaient les anneaux agés et les trophozoïtes jeunes. De même Geary *et al.*, (1989) ont montré que les stades les plus sensibles étaient ceux présents en fin de cycle. Par contre, les résultats sont légèrement différents de ceux

reportés par Skinner *et al.* (1996) qui ont montré que la Q était très actif sur les derniers stades du cycle. Cependant, ils ont travaillé sur un modèle pharmacologique différent avec l'application du traitement à 0, 24 et 36ème heure pendant 10 heures en faisant des calculs de pourcentage d'inhibition toutes les 2 heures. C'est pourquoi à la CI_{90} ils ont trouvé 80 % d'inhibition pour les schizontes (CI_{50} entre 30 et 300 nM); alors que pour la CI_{90} de nos souches, nous avons trouvé environ 60 % d'inhibition. En revanche, ils présentent 100 % d'inhibition pour les trophozoïtes en accord avec nos résultats d'environ 100 % d'inhibition à la CI_{90}, montrant que ce stade de *P. falciparum* FcB1 est le plus sensible à la Q.

Les CI_{50} obtenues avec la Q sont plus basses en début de cycle jusqu'à la 32ème heure; puis les valeurs de CI_{50} augmentent et montrent la faible sensibilité des schizontes et des mérozoïtes de *P. Falciparum* FcB1 à la Q. Cela confirme la plus grande activité de la Q en début de cycle sur les parasite au stade anneaux – trophozoïtes.

2.3. Détermination du stade sensible à la chloroquine *in vitro*

Les essais initiaux ont montré des pourcentages d'inhibition très élevés ne permettant pas de calculer les CI_{50} mais qui cependant montrent une diminution significative de la sensibilité de *P. falciparum* FcB1 à la CQ vers la fin du cycle (schizontes et mérozoïtes). La Figure 14 montre les stades les plus sensibles anneaux agés, trophozoïtes jeunes et trophozoïtes agées; les anneaux jeunes et schizontes jeunes ont montré une sensibilité moyenne et les schizontes agés et les mérozoïtes ont présenté une faible sensibilité.

Nos résultats coïncident avec ceux de Ter-Kuile *et al.* (1993) et Zhang *et al.* (1986) qui, *in vitro* sur *P. falciparum*, ont trouvé que les stades les plus sensibles étaient les anneaux et les trophozoïtes. Yayon *et al.* (1983) ont montré la sensibilité des trophozoïtes et la sensibilité moyenne des schizontes et anneaux jeunes. D'autre part Caillard *et al.*, (1992) et Chimanuka *et al.*, (2001) ont reporté sur le modèle *in vivo* avec *P. vinckei petteri* et *P. chabaudi chabaudi* respectivement, les trophozoïtes comme le stade le plus sensible, ce qui est aussi en accord avec nos résultats. Pour la CQ les CI_{50} obtenues présentent les valeurs les plus basses sur les stades anneaux agés, trophozoïtes jeunes et trophozoïtes agées; ensuite les valeurs de CI augmentent en montrant la faible sensibilité des schizontes agés et des mérozoïtes.

2.4. Détermination du stade sensible à l'artéméther *in vitro*

Les essais initiaux ont montré des pourcentages d'inhibition très élevés qui n'ont pas permis le calcul des CI mais qui ont malgré tout montré une diminution significative de la sensibilité à l'ART des schizontes agés et des mérozoïtes de *P. falciparum* FcB1. La Figure 15 montre pour l'ART une très bonne activité tout au long du cycle sauf pour ces deux stades, alors que les stades les plus sensibles vont des anneaux jeunes jusqu'aux trophozoïtes jeunes; quant aux schizontes jeunes ils ont montré une sensibilité moyenne.

Nos résultats correspondent à ceux de Skinner *et al.* (1996), compte tenu des considérations exprimées précédemment dans les résultats sur la quinine, si nous observons les pourcentages d'inhibition les plus élevés, ils ont été obtenus avec des anneaux. En employant le modèle *in vivo* Caillard *et al.* (1992) travaillant avec l'arteether structurellement très semblable à l'artéméther, et Chimanuka *et al.* (2001) ont montré l'activité de l'ART tout au long du cycle avec les trophozoïtes jeunes et moyens, respectivement les plus sensibles. Les CI_{50} obtenues avec l'ART sont basses tout au long du cycle avec des valeurs semblables à celles obtenues avec le BM; les valeurs de CI_{50} augmentent un peu vers la fin du cycle.

3. ETUDE *IN VITRO* DE LA COMBINAISON ENTRE LE BLEU DE METHYLENE ET DIVERS COMPOSES ANTIPALUDIQUES

La recherche d'une synergie d'action dans l'association du BM avec d'autres drogues a été réalisée en utilisant le modèle mathématique de Berembaum décrit précédemment (Berembaum *et al.*, 1978). Ce modèle permet une représentation graphique, sous forme d'isobologrammes, des résultats des associations sur la croissance de *P. falciparum*. Nous avons également calculé les concentrations inhibitrices partielles (FIC) selon le procédé décrit ci-dessus.

Un isobologramme concave par rapport à la droite d'additivité (correspondant à l'activité des produits seuls), représente un effet synergique entre les deux molécules associées, un isobologramme convexe, un effet antagoniste et un isobologramme qui croise la ligne d'additivité révèle un effet additif.

3.1. Interactions générales

Les résultats des études de combinaison ont montré que les interactions avec le BM vont de l'antagonisme au synergisme (Figures 16 à 24 et Tableau 9): antagonisme avec l'AMO; antagonisme/additivité avec l'ATO, la DOX et la PYR; additivité/pas d'interaction avec l'ART, la CQ, la MEF et la PRIM et synergie avec la Q.

Drogue combinée avec le MB	FIC Moyenne *	Interaction
Amodiaquine	1,28±0,11	Antagonisme
Artemether	0,95±0,05	Additivité / pas d'interaction
Atovaquone	1,24±0,17	Antagonisme / Additivité
Chloroquine	1,03±0,08	Additivité / pas d'interaction
Doxycycline	1,44±0,28	Antagonisme / Additivité
Mefloquine	0,97±0,12	Additivité / pas d'interaction
Primaquine	0,93±0,08	Additivité / pas d'interaction
Pyrimethamine	1,15±0,10	Antagonisme / Additivité
Quinine	0,74±0,11	Synergie

Tableau 9. *Concentrations inhibitrices partielles (FIC) de la combinaison du bleu de méthylène avec des antipaludiques classiques contre* P. falciparum *FcM29.* * Somme FIC = Moyenne des Sommes des concentrations inhibitrices partielles ± Ecartype. (entre 5 et 20 déterminations). Additivité, somme des FIC = 1; synergie, somme des FIC < 1; et antagonisme, somme des FIC > 1.

Plusieurs auteurs reportent une seule valeur représentative des sommes des FIC, à une concentration, pour montrer l'interaction des drogues (Canfield *et al.*, 1995; Ringwald *et al.*, 1999); d'autres présentent la moyenne des sommes FIC ± l'ecartype (Ohrt *et al.*, 2002; Akoachere *et al.*, 2005) et d'autres encore reportent la valeur moyenne avec des intervalles de confiance de 95 % (Fivelman *et al.*, 2004). Nous avons présenté les résultats des sommes FIC comme la moyenne des sommes FIC ± ecartype (Tableau 9).

Compte tenu du fait que certaines associations avec le BM donnent lieu à des valeurs proches de l'unité où la différenciation entre un effet additif, antagoniste ou synergique n'est pas évidente (ATO et PYR), et pour donner plus de clarté en relation avec des interactions, nous avons utilisé une méthode statistique plus exigeante avec des intervalles de confiance de 95 % (Fivelman *et al.*, 2004; Fillaux, 2006).

Drogue combinée avec le BM	somme FIC Moyenne	Ecartype x 1,96	Intervalle de confiance 95%	
AMO	1,28	0,22	1,06	1,49
ART	0,95	0,11	0,84	1,06
ATO	1,24	0,33	0,91	1,57
CQ	1,03	0,15	0,88	1,18
DOX	1,44	0,55	0,89	1,98
MEF	0,97	0,23	0,74	1,20
PRI	0,93	0,17	0,77	1,10
PYR	1,15	0,20	0,95	1,35
Q	0,74	0,21	0,54	0,95

Tableau 10. *Intervalles de confiance de 95 % pour les sommes FIC de la combinaison du bleu de méthylène avec des antipaludiques classiques contre* P. falciparum *FcM29.*

La tableau 10 présente les intervalles de confiance à 95 % déterminés en s'assurant que la variable « sommes FIC » est aléatoire avec une distribution normale (« Sommes FIC » est une variable continue et la densité des données de la variable donne naissance à une courbe symétrique centrée sur la valeur de la moyenne Figure 69). Le méthode statistique employée est : Limite = Moyenne ± 1,96 x Ecartype (Fillaux, 2006; Milton, 1998), qui nous donne des limites avec un intervalle de confiance à 95 %.

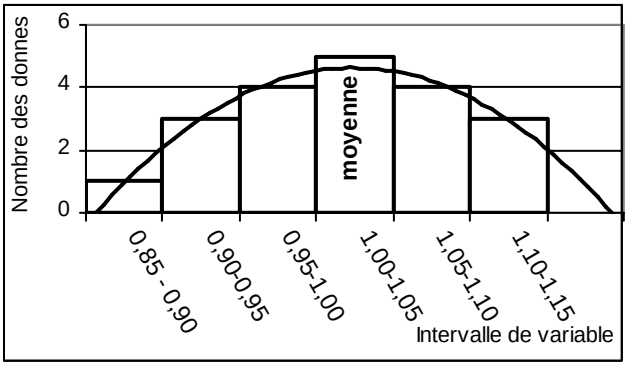


Figure 69. *Histogramme de la variable « sommes FIC » pour la CQ.*

L'application des intervalles de confiance à la détermination de l'interaction du BM avec les autres antipaludiques classiques donne lieu à la Figure 70 selon laquelle les interactions son: antagonisme avec l'AMO; additivité avec l'ART, l'ATO, la CQ, la DOX, la MEF, la PRIM et la PYR; et synergie avec la quinine. Les résultats obtenus

pour l'ATO et la PYR ne permettent pas de rejeter l'hypothèse d'égalité à l'unité, donc selon cette méthode statistique plus exigeante ces drogues sont additives avec le BM.

En ce qui concerne la DOX, l'application de cette méthode statistique conduit à une interaction de type antagoniste / additivité. Ceci s'explique par la très grande variabilité des résultats obtenus avec des écartypes considérables sur les 15 déterminations.

Pour toutes les autres drogues, nous confirmons le résultat obtenu avec l'isobologramme et la somme FIC ± l'ecartype; il est important de souligner l'antagonisme du BM avec l'AMO, confirmé par les intervalles de confiance à 95 %. Il en est de même pour la synergie du BM avec la Q confirmée par cette méthode statistique.

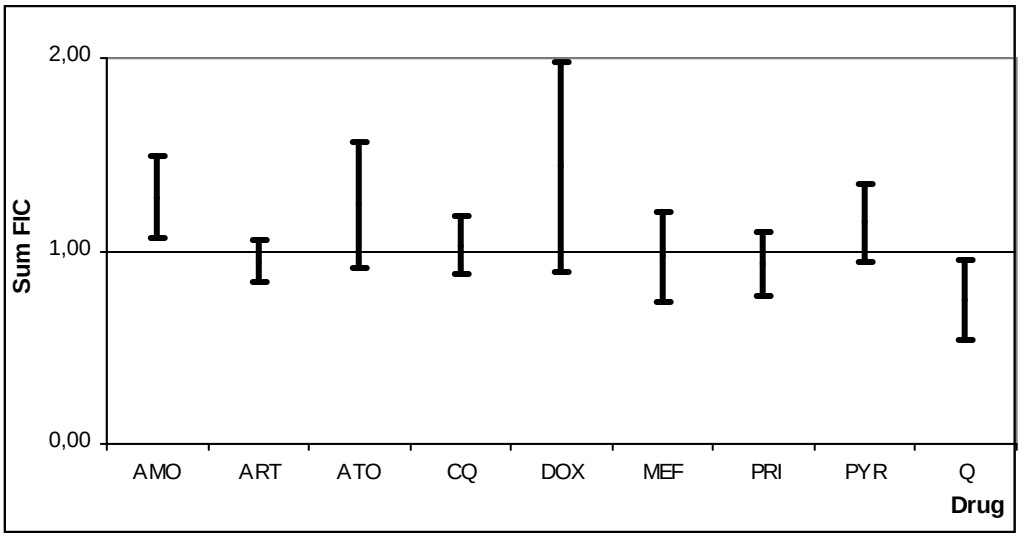


Figure 70. *Intervalles de confiance à 95 % pour les sommes FIC de la combinaison du BM avec des antipaludiques classiques contre* P. falciparum *FcM29.*

Akoachere *et al.*, (2005) ont trouvé que le BM était antagoniste avec l'AMO, la CQ, la PRIM et la PYR; additif avec la MEF et la Q; synergique avec l'ART, l'artémisinine et l'artésunate, face à la souche K1 de *P. falciparum*. L'antagonisme avec l'AMO et la CQ semble intéressant compte tenu que le BM est connu pour augmenter l'activité des 4-aminoquinolines. En fait, le BM est une base particulièrement faible (pKa 0-1) (Keene *et al.*, 1965; Pottier *et al.*, 1975) qui s'accumule à l'intérieur du globule rouge infecté dans lequel il est réduit et concentré probablement dans la vacuole digestive

où il empêche la formation de l'hémozoïne (Atamna *et al.*, 1996), tout comme les 4-aminoquinolines. Par ailleurs le BM empêche la glutathion réductase du parasite et compromet ainsi la fonctionnalité du glutathion (Färber *et al.*, 1998). Ce phénomène devrait augmenter l'activité de la chloroquine dont l'activité est liée aux niveaux de glutathion (Meierjohann *et al.*, 2002).

Il est important de souligner que nos essais ont été développés avant la publication d'Akoachere *et al.*, (2005) et que nous avons étudié l'interaction du BM avec des antipaludiques classiques dans un modèle légèrement différent; au lieu d'employer une culture très peu parasitée (0,125 %) pendant les 72 h et d'incorporer l'hypoxanthine radioactif 48 h après le début de l'expérience, nous avons commencé par une parasitémie plus élevée (1-2 %) et nous avons fait le radio-marquage au temps zéro plus 32 h pendant 16 h; nous avons fini l'expérience à la 48ème heure.

Les résultats ont été légèrement différents: nous avons trouvé des associations de type antagoniste entre le BM et l'AMO et antagoniste/additif avec la DOX, l'ATO et la PYR alors que dans l'étude d'Akoachere l'AMO, la CQ, la PRI et la PYR ont été antagonistes. Bien que l'AMO appartienne à la même classe chimique de composés que la CQ, les 4-aminoquinolines, l'association du BM avec cette drogue a été antagoniste dans les deux études. Médicalement, l'activité antipaludique de l'AMO est principalement exercée par la desethylamodiaquine (Mariga *et al.*, 2005) suggérant qu'une autre étude de combinaison entre le BM et la desethylamodiaquine devrait être menée.

La DOX et la PYR sont des antipaludiques très bon marché, malheureusement ces produits ont été antagoniste/additif avec le BM face à *P. falciparum* FcM29 (DOX n'a pas été testée dans l'étude d'Akoachere). Dans le cas de l'ATO, quel que soit le mécanisme de l'antagonisme/additivité observé, une combinaison avec cette drogue n'est pas essentielle étant donné son prix prohibitif.

Au cours de nos essais, l'association du BM avec la Q était synergique (additif dans l'étude d'Akoachere). La Q présente des similitudes avec le BM: nous avons montré que l'activité des deux drogues est dirigée contre les étapes initiales du cycle sanguin (Q a été aussi légèrement actif contre les trophozoïtes agés). Comme le BM, la Q est une base faible qui s'accumule dans la vacuole digestive acide où elle subit une protonation. Malheureusement l'utilisation de la Q est limitée par sa longue durée de traitement, qui est à l'origine d'une faible adhérence au protocole de soins avec un risque d'échec, et sa toxicité (chez des personnes déficitaires en G6PD)

(Baird, 2005). Néanmoins la Q reste une drogue peu coûteuse et la résistance à la quinine est sporadique. D'autres études *in vivo* sont nécessaires pour déterminer le meilleur rapport toxicité/activité.

Nous avons également observé des interactions additives/pas d'interaction entre le BM et l'ART, la CQ, la MEF et la PRI. L'ART est une drogue de choix et a été synergique dans l'étude d'Akoachere. Malgré son prix prohibitif qui rend le développement de combinaisons avec l'ART difficile; les thérapies basées sur la combinaison avec les dérivés de l'artemisinine (ou ACTs) sont les meilleurs traitements antipaludiques disponibles actuellement et sont recommandées par l'OMS depuis 2001 (Mutabingwa, 2005).

L'association avec la MEF est additive dans les deux études mais ce n'est pas un candidat optimal en raison de la persistance des concentrations subinhibitrices pendant de longues périodes (élimination $t_{1/2}$, 2 semaines) (Karbwang *et al.*, 1988; Mansor *et al.*, 1989) pour cette raison la MEF peut provoquer une sélection de populations parasitaires résistante. Par ailleurs, elle est trop chère pour une utilisation dans le système de santé courant dans les pays en voie de développement.

La PRI est un schizonticide tissulaire qui nécessite des traitements longs (7 jours - 8 semaines) et est connu pour être responsable d'épisodes hémolytiques chez des sujets qui présentent une insuffisance en G6PD (Baird, 2005). La combinaison de PRI avec le BM devrait être soigneusement évaluée pour déterminer si le rapport toxicité/activité est favorable. L'essai de cette combinaison *in vivo* ne devrait pas être prioritaire également parce que Akoachere (Akoachere *et al.*, 2005) l'a trouvée antagoniste.

Mandi (Mandi *et al.*, 2005) et Meissner (Meissner *et al.*, 2005) ont souligné, dans des essais chez l'homme, la pertinence de la combinaison BM+CQ en Afrique. Cependant une étude complémentaire a démontré le contraire (Meissner *et al.*, 2006). Ceci est décevant car la CQ reste l'antipaludique le meilleur marché et facilement accessible dans les pays en voie de développement; ce résultat est en concordance avec nos résultats *in vitro* (additivité / non interaction) et avec les résultats de Akoachere et col. qui ont montré un antagonisme entre la CQ et le BM.

En conclusion, nos résultats sont globalement comparables à ceux d'Akoachere. L'additivité avec la MEF et l'antagonisme avec l'AMO (nous avons également montré l'antagonisme/additivité avec la DOX et l'ATO, non examinés dans l'étude

d'Akoachere) ont été soutenus dans les deux études. L'association avec la Q a été synergique au cours de nos essais et additif dans leur étude. L'ART a été synergique dans l'étude d'Akoachere et additif pour nous également. Par contre, nous avons trouvé de l'additivité avec la CQ et la PRI tandis que l'antagonisme était montré par Akoachere. Ces anomalies suggèrent que des études *in vivo* devraient être entreprises pour éviter les associations insatisfaisantes qui pourraient compromettre le retour du MB dans le traitement du paludisme.

CHAPITRE 2
TECHNIQUES D'ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIPALUDIQUE *IN VIVO*

Nous avons travaillé au Laboratoire de Parasitologie Humaine Comparée du Muséum Nationale d'Histoire Naturelle à Paris (MNHN), nous nous sommes intéressés aux stades sanguins mais aussi à la transmission.

1. TEST SUPPRESSIF DE 4 JOURS OU TEST DE PETERS

Nous avons étudié des modèles de *Plasmodium* de rongeurs et en particulier *Plasmodium yoelii yoelii, P. yoelii nigeriensis, P. berghei* NK65 et *P. vinckei petteri*; nous avons montré que dans les conditions de notre essai, la souche *P. yoelii nigeriensis* a la plus haute cinétique d'infection donc c'est la souche que nous avons choisie pour les essais. Nous avons pratiqué le test de quatre jours mis au point par Peters (Peters et Robinson, 1999; Deharo, 2000; Garavito, 2003)

La figure 71 présente une comparaison des DE_{50} de BM obtenues sur différentes souches. Avec *P. berghei* ANKA nous avons travaillé à Bogotá et avons trouvé des valeurs comprises entre 18,9 et 6,8 mg/Kg, c'est une souche asynchrone et sensible à la CQ (DE_{50}=0,53 mg/Kg ; Garavito, 2003). Avec *P. yoelii nigeriensis*, souche asynchrone, du MNHN nous avons trouvé pour le BM des DE_{50} de 14,8, 23,9 et 19,4 mg/Kg comme Atamna (1996) qui a trouvé 11,03 mg/Kg. Enfin, pour *P. vinckei petteri* une souche synchrone ces auteurs ont trouvé une DE_{50} de 1,21 mg/Kg.

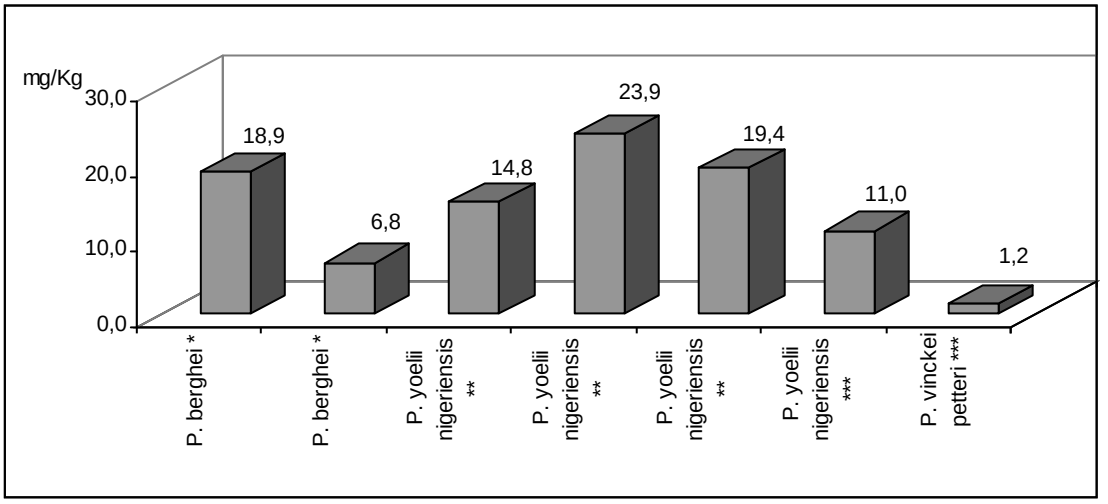


Figure 71. *Comparaison des DI_{50} de BM dans différents essais et souches.* * Essais faits à DFUNC, (Garavito, 2003); ** Essais faits à MNHN; *** Atamna *et al.*, 1996.

Les valeurs de DE_{50} sont toutes au même niveau d'activité que celle de la CQ pour laquelle *Plasmodium yoelii nigeriensis* a montré une DE_{50} de 1,21 mg/Kg, Figure 25, en étant plus résistant que *P. berghei* ANKA (DE_{50}=0,53 mg/Kg; Garavito, 2003). La faible valeur de DE_{50} obtenue avec le BM sur *P. vinckei petteri* s'explique par le fait qu'il s'agise d'une souche plus sensible et synchrone (Atamna *et al.*, 1996).

Les résultats montrent que le BM présente une bonne activité *in vivo* sur différentes souches de *Plasmodium* de souris.

2. EVALUATION DE L'ACTIVITE SUR STADES HEPATIQUES (INHIBITION DE L'INVASION)

Une substance active à ce niveau doit inhiber complètement le développement de l'infection sanguine ; le léger retard dans le développement de l'infection du groupe traité avec le BM (Figure 26) est probablement dû à du BM résiduel dans la circulation sanguine (cependant, la demi-vie moyenne reportée chez l'homme pour le BM est comprise entre 5 et 6,5 heures (Peter *et al.*, 2000)).

Par conséquent le BM est inactif sur les stades hépatiques de *P. yoelii yoelii*.

CHAPITRE 3
TECHNIQUE D'ETUDE DE LA CYTOTOXICITE

1. ESSAIS PRELIMINAIRES

Afin d'évaluer la cytotoxicité du BM, nous avons déterminé son activité antiproliférative et sa concentration létale sur les cellules BJAB maintenues en culture continue au laboratoire (Diller *et al.*, 2005). La réponse de radioactivité (CPM), obtenue sur différentes concentrations de cellules BJAB (Figure 27), nous a montré que la zone de linéarité se trouvait entre 31 250 et x10^6 cellules/ml. Par conséquent, avec 10^6 cellules/ml (200 000 cellules/puits) au départ de l'essai, nous conservons une bonne réponse en maintenant la proportionnalité dans la lecture s'il y a diminution cellulaire due à une cytotoxicité éventuelle.

Dans notre essai, les cellules BJAB sont sensibles à la doxorubicine (Figure 28) avec une valeur de CT_{50} (416 +/- 8 nM) très similaire à celle obtenue sur les cellules MCF-7, P388/WT et HT29, toutes présentées comme sensibles Tableau 11 (Peer *et al.*, 2004).

Ligne cellular	CT_{50} (nM)	Sensibilité *	Origine
MCF-7	350	Drogue sensible	Carcinome humain de sein
P388/WT	4700	Drogue sensible	Murin leucémie
HT29	3600	Drogue sensible	Carcinome humain de colon
B16F10.9	12000	Résistance innée (P-glycoprotéine)	Mélanome fortement agressif de souris
D122	19000	Résistance innée (P-glycoprotéine)	Carcinome de poumon de souris (de Lewis)
C-26	25000	Résistance innée (P-glycoprotéine)	Carcinome de colon
MCF-7/ADR	19000	Résistance acquise (P-glycoprotéine)	Dérivé de MCF-7
P388/ADR	31000	Résistance acquise (P-glycoprotéine)	Dérivé de P388/WT

Tableau 11. *Sensibilité de différentes lignes cellulaires à la doxorubicine (Peer et al., 2004).*

2. TEST DE CYTOTOXICITE

Le BM, a une CT_{50} de 577+/-12 nM; valeur qui est au niveau de celle l'obtenue avec la doxorubicine et est loin de la valeur obtenue avec la CQ. (11563 +/- 1647 nM) Figure 29. Préalablement Vennerstrom (1995) a reporté une CT_{50} de 1610 nM pour le BM sur la lignée cellulaire KB (carcinomé epidermoide humain de la bouche)

et Atamna (1996) a reporté une CT_{50} de 26700 nM pour le BM sur la ligne cellulaire J-111 (monocytes humains dérivés de leucémie). Néanmoins, Kirszberg *et al.* (2005) ont prouvé que le BM était plus toxique aux cellules de leucémie, qu'aux cellules normales, ceci peut expliquer nos résultats car des cellules BJAB sont dérivées de lymphoblastes.

Il faut souligner que dans les essais *in vivo* d'activité antipaludique (décrits au chapitre 2) et dans des essais réalisés précédemment (Garavito, 2003) où l'administration du BM se faisait pendant 4 jours consécutifs et compte tenu de la symptomatologie et mortalité de l'infection palustre de ces essais, nous n'avons pas détecté de signes représentatifs de toxicité aiguë par rapport à la survie laquelle est similaire au groupe contrôle; tous les animaux survivent avec la plus forte dose (50 mg/Kg).

Le BM a été reporté pour sa toxicité hématologique; bien que le BM est employé dans le traitement de la méthémoglobinémie, il peut aussi provoquer la formation de méthémoglobine dans l'érythrocyte (à des concentrations élevées le BM oxyde le fer ferreux de l'hémoglobine à l'état ferrique en produisant de la méthémoglobine). Hejtmancik (2002) a étudié la toxicité hématologique du BM chez des rats et des souris à des doses de 25, 50, 100 et 200 mg/Kg. En général à la fin de l'étude, la survie et le poids corporel n'ont pas de différences significatives sauf à la dose de 200 mg/Kg. La toxicité hématologique est présente à des doses plus élevées et au cours de traitements sub-chroniques. La sécurité du BM utilisé comme antipaludique chez des patients présentant une insuffisance de G6PD a été étudiée par Mandi (2005) et Meissner (2005) qui ont conclu que le BM ne présentait pas de toxicité aux doses utilisées, même chez des enfants.

Les Indices de Sélectivité des drogues étudiées sur des souches de *P. falciparum* F32, HB3, FcB1 et FcM29 sont présentés dans la Figure 30. En général, pour les souches chloroquine sensibles (F32 et HB3) les valeurs de IS sont supérieures par rapport aux souches résistantes (FcB1 et FcM29). De même, les IS de la CQ sont supérieurs à ceux du BM chez les souches sensibles, avec la valeur la plus élevée sur HB3 où la CT_{50} est 319 fois supérieure à la CI_{50}. Par contre avec des souches résistantes cette situation change et le BM présente des IS supérieurs. Il faut souligner que la souche la plus résistante à la CQ (FcM29) a présenté avec le BM un IS 5 fois supérieur à celui de la CQ. Avec la lignée cellulaire BJAB, le BM a des valeurs IS au même niveau que la CQ sur plusieurs souches de *P. falciparum*

présentant différents niveaux de sensibilité à la CQ et provenant de différents endroits géographiques. Les deux drogues ont des IS acceptables entre 19 et 319 avec la plus petite valeur pour la CQ (FcM29) et la plus haute valeur pour la CQ (HB3).

Vennerstrom (1995) a reporté, sur les cellules KB, des IS de 450 (avec à *P. falciparum* D6) et 404 (avec à *P. falciparum* W2). Atamna (1996) a également montré, avec la ligne cellulaire J-111, des IS de 14278 (face à *P. falciparum* D6), 17682 (avec *P. falciparum* FCR3) et 2342 (avec *P. falciparum* W2).

CHAPITRE 4
ETUDE DES MECANISMES D'ACTION

1. MODELE PHARMACOLOGIQUE D'ETUDE DE L'INTERACTION HEME/GLUTATHION

Nous avons tout d'abord déterminé les meilleures conditions expérimentales pour effectuer l'analyse, à partir des données rapportées par Ginsburg *et al.* (1998). L'étude de CLHP de la dérivation du GSH par l'OPA a montré un rapport optimal GSH/OPA de 1/50 et un temps de dérivation d'OPA de 5 min. Les conditions suivantes ont été également établies: GSH/hème: 1/1; drogue/GSH/hème: 1/1/1 et temps d'incubation: 30 min. Etant donné que sous azote la dégradation de l'hème dépendante du GSH a été inhibée, les essais ont été effectués sous atmosphère normale. Nous avons montré que la diminution de l'intensité de fluorescence dans le mélange d'hème-GSH est lié à la diminution de la concentration de GSH.

La dégradation de l'hème en présence du glutathion a été précédemment décrite par Atamna et Ginsburg (1995) qui ont montré que le GSH pouvait dégrader rapidement l'hème ($t_{1/2}$ = 70s) en solution à 37 ºC et à pH 7. L'inhibition, par les antipaludiques, de la dégradation de l'hème dépendante de GSH a été décrite par certains auteurs en employant diverses méthodes (Tableau 12). Notre technique est basée sur la détection d'un adduit fluorescent formé entre l'o-phthalaldehyde et le GSH, pour déterminer l'impact des drogues sur la dégradation de l'hème dépendante

de le GSH. L'OPA réagit avec le groupe sulfhydrylique de l'amine primaire du GSH pour former un adduit fortement fluorescent et relativement stable pendant 24 h à 4 ºC dans l'obscurité, Figure 72 (Cereser *et al.*, 2001).

Drogue	Dégradation de l'hème dépendante de GSH	Méthodologie	Référence
AMO	Inhibition Inhibition en solution et lié à des protéines	Suivi de l'hème par spectrophotométrie UV-Vis à 400 nm Suivi de l'hème par spectrophotométrie UV-Vis à 396 nm	Ginsburg *et al.* 1998 Famin *et al.* 1999
CQ	Inhibition Inhibition Inhibition en solution et lié à des protéines	Suivi de l'hème par spectrophotométrie UV-Vis à 400 nm Diminution du shunt des hexoses monophosphate par union de la ferriprotoporphyrin IX à des protéines Suivi de l'hème par spectrophotométrie UV-Vis à 396 nm	Ginsburg *et al.* 1998 Famin et Ginsburg 2003 Famin *et al.* 1999
MEF	Inhibition Inhibition en solution (pas d'inhibition quand lié à des protéines)	Suivi de l'hème par spectrophotométrie UV-Vis à 400 nm Suivi l'hème par spectrophotométrie UV-Vis à 396 nm	Ginsburg *et al.* 1998 Famin *et al.* 1999
Q	Inhibition en solution (pas d'inhibition quand lié à des protéines)	Suivi l'hème par spectrophotométrie UV-Vis à 396 nm	Famin *et al.* 1999

Tableau 12. *Activité de drogues sur la dégradation de l'hème dépendante du GSH.*

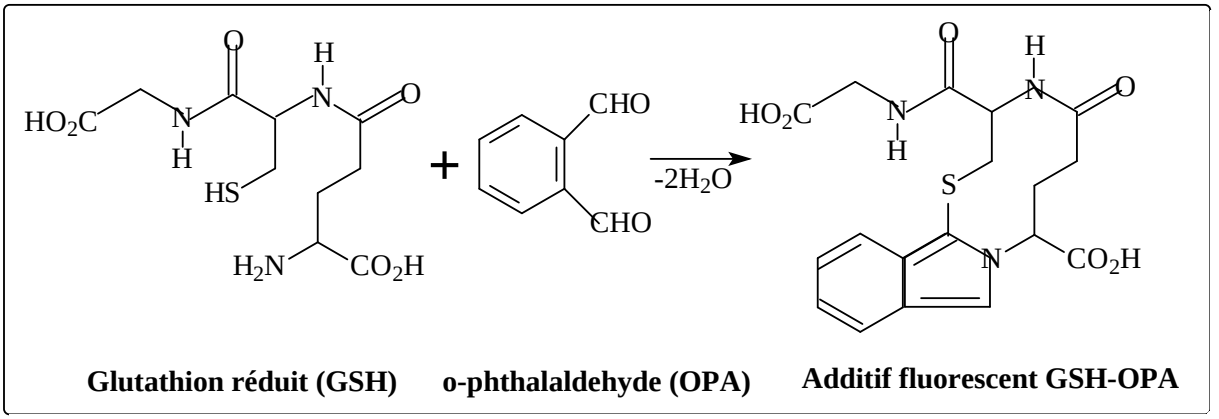


Figure 72. *Formation de l'adduit fluorescent entre OPA et GSH.*

1.1. Essais préliminaires

En utilisant le BM nous avons évalué l'impact du temps d'incubation et de la température. Dans un premier temps, nous avons travaillé sur une durée de 60 min avec des observations toutes les 20 min (t=0, 20, 40 et 60 min), puis nous avons fait varier la température (ambiante et 37°C.)

a. Stabilité des composés

a.1. Bleu de méthylène

Sur la Figure 31, la valeur de l'UFR sans l'OPA ne varie pas significativement par rapport aux valeurs obtenues aux différents temps. Par conséquent il n'existe pas d'interaction entre le BM et l'OPA susceptible de donner lieu à des variations de fluorescence affectant les résultats de l'essai.

a.2. Glutathion réduit

Les valeurs d'UFR de l'adduit GSH-OPA sont les plus élevées et varient peu au cours du temps, donc l'adduit GSH-OPA est stable (Figure 32).

a.3. L'hème

Apparemment il n'existe pas d'interaction entre l'hème et l'OPA pouvant donner lieu à des variations de fluorescence susceptibles d'affecter les résultats de l'essai (Figure 33). Par ailleurs la fluorescence de l'hème ne varie pas tout au long du temps d'observation.

a.4. L'o-phthalaldehyde

Comme le montre la Figure 34, il n'y a pas de variation de fluorescence au cours du temps. L'OPA est donc stable tout au long de l'essai.

b. Temps d'incubation

La Figure 35 nous permet de voir une diminution de fluorescence significative pour le contrôle de dégradation (GSH+Hème) à partir de 20 min jusqu'à 60 min (temps d'observation finale). Pour le mélange (BM+GSH+HEM) on observe un comportement similaire.

Compte tenu de ces résultats, le temps d'observation a été fixé à 30 min (lignes discontinues dans la Figure 35).

c. Température d'incubation

La dégradation de l'hème en présence du GSH en solution à 37 ºC et à pH 7 a été décrite précédemment (Atamna et Ginsburg, 1995) ainsi que par nos propres essais. Afin d'évaluer si l'essai est robuste face à la température nous avons fait l'essai à température ambiante (18 +/- 2 °C) et à 37 °C, pour : le BM, la CQ, la Q, l'ATO et la PRI.

Les pourcentages de GSH restant après 30 min d'incubation à température ambiante sont 23+/-7 %, soit plus élevés que ceux obtenus à 37 °C (Figure 36). L'essai doit apporter une évidence expérimentale en relation à la capacité d'une drogue d'empêcher la dégradation de l'hème par le GSH avec un intervalle de confiance supérieur à 95 % (valeur p < 0,05). La Figure 73, donne la comparaison des valeurs p obtenues.

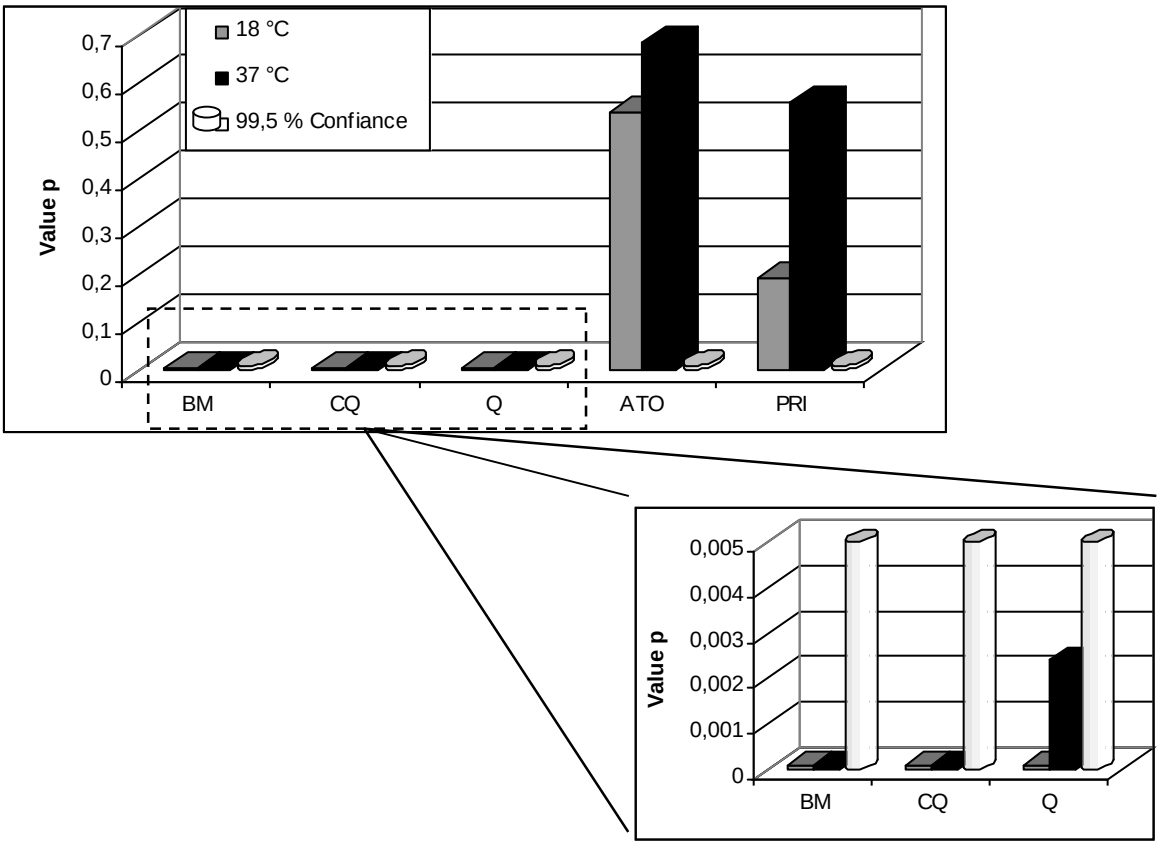


Figure 73. *Comparaisons de valeurs p obtenues pour les drogues à différentes températures d'incubation.* 3 essais indépendants.

Les drogues BM, CQ et Q ont montré des valeurs p inférieures à 0,005 dans les calculs statistiques de comparaison de moyennes par le test de student (Programme STATA 7,0) que ce soit à température ambiante ou à 37 °C. L'ATO et la PRI ont donné des valeurs p supérieures à 0,1 aux deux températures évaluées.

Selon ces résultats, la température d'incubation n'affecte pas de manière significative les résultats de l'essai.

d. Effet de solvant (méthanol)

Le méthanol a été employé comme solvant pour certaines drogues quand elles sont insolubles dans le RPMI; une concentration de 0,35 % (dans le puits), qui est la plus haute concentration utilisée au cours des essais ne présente pas d'interaction avec le GHS, l'HEM ou l'OPA (Figure 37).

1.2. Test sur l'interaction hème/glutathion

Les mélanges suivants: drogue / GSH (50 µM / 50µM), drogue / hème (50 µM / 50 µM), drogue / OPA (50 µM / 2,5 mM), hème / OPA (50 µM / 2,5 mM), GSH / OPA (50 µM / 2,5 mM) et tampon HÉPÈS / OPA (0,2 M / 2,5 mM) ont été employés comme contrôles pour déterminer des interactions éventuelles donnant une émission de fluorescence. De même, une lecture avant l'addition de l'OPA a été réalisée pour mettre en évidence une éventuelle autofluorescence des molécules dans les conditions de l'essai.

a. Amodiaquine

La Figure 38 présente les résultats généraux de fluorescence des différents échantillons étudiés. On constate une diminution de la fluorescence quand on compare le GSH par rapport au GSH+HEM. Cette diminution a été trouvée tout au long des essais réalisés avec toutes les drogues.

Les valeurs de l'UFR de la drogue avec le GSH (AMO+GSH) sont significativement inférieures à celle du GSH seul tant à t=0 min qu'à t=30 min. Cela montre une interaction possible du GSH avec l'AMO, probablement par le biais du groupe hydroxyle (Figure 38).

La fluorescence de l'hème ne varie pas significativement par rapport à l'échantillon drogue-hème, mais quand on compare la fluorescence de l'AMO toute seule par rapport à l'AMO+HEM, il y a une diminution qui signe une interaction possible.

Comme les valeurs de l'UFR sont basses, cette interaction n'affecte pas significativement le résultat de l'essai (Figure 38).

La fluorescence à t=0 avec AMO+GSH+HEM est inférieure à celle obtenue avec le contrôle GSH+HEM (Figure 39). Cela montre une limitante de l'essai quand la molécule a des groupes hydroxyle libres. Pour l'AMO, quel que soit le type d'interaction, ceci ne change pas significativement au long de l'essai (Figures 38 et 39).

En considérant que les interactions mentionnées sont constantes tout long de l'essai, la Figure 39 présente un taux de diminution de la fluorescence plus grand pour le contrôle (GSH+HEM) que pour l'échantillon (AMO+GSH+HEM). Le pourcentage de GSH restant (en comparant la quantité de GSH à t=0 par rapport a la quantité à t=30) révèle donc un taux inférieur de dégradation quand l'AMO est présente. Ceci s'explique soit parce que la drogue empêche la réaction de dégradation de l'hème par le GSH soit elle diminue l'oxydation du GSH en GSSG (Figure 40).

Dans tous les cas cette drogue maintient une plus grande concentration du GSH dans le milieu réactionnel.

b. Artemether

Tous les contrôles présentent un comportement normal dans le cas de l'ART, il n'y a donc pas d'interaction pouvant affecter les résultats de l'essai Figure 41.

La Figure 42 présente une diminution de la fluorescence plus grande pour le contrôle (GSH+HEM) que pour l'échantillon (ART+GSH+HEM). Aussi le pourcentage de GSH restant révèle un taux inférieur de dégradation quand l'ART est présente. Cette drogue maintient donc une plus grande concentration de GSH dans le milieu réactionnel, en réduisant probablement son oxydation en GSSG.

c. Atovaquone

Tous les contrôles présentent un comportement normal dans le cas de l'ATO; il n'y a donc pas d'interaction pouvant affecter le résultat de l'essai (Figure 43).

La Figure 44 présente une diminution de fluorescence similaire pour le contrôle (GSH+HEM) et l'échantillon (ATO+GSH+HEM). Aussi les pourcentages de GSH restant après 30 min ne sont pas significativement différents. Par conséquent cette drogue n'augmente pas la concentration de GSH dans le milieu réactionnel.

Ce résultat est logique puisque le mécanisme d'action de l'ATO repose sur la chaîne de transfert des électrons de la mitochondrie (Olliaro 2001; Mather *et al.*, 2005) et démontre la capacité de l'essai à discriminer des drogues n'agissant pas sur la dégradation de l'hème par le GSH.

d. Bleu de méthylène

Tous les contrôles présentent un comportement normal dans le cas du BM. Il n'y a donc pas d'interaction pouvant affecter le résultat de l'essai (Figure 45).

La Figure 46 présente une diminution de fluorescence plus importante pour le contrôle (GSH+HEM) que pour l'échantillon (BM+GSH+HEM). Le pourcentage de GSH restant témoigne d'une dégradation inférieure en présence de BM; car cette drogue maintient une plus grande concentration de GSH dans le milieu réactionnel, en réduisant probablement son oxydation en GSSG. Le BM a été reporté aussi comme inhibiteur de la glutathion réductase du parasite; cette activité et celle décrite ici démontrent que le BM est une molécule très active au niveau de la dégradation de l'hème par le GSH (Becker *et al.*, 2003).

Ces résultats obtenus avec le BM ont aussi été confirmés par les cinétiques menées pendant 60 min avec des observations toutes les 20 min (Figure 35).

e. Chloroquine

Nous avons observé une variation significative entre la fluorescence de l'hème et celle de l'échantillon drogue-hème (Figure 48); il existe donc une interaction. La CQ est connue pour son interaction avec l'hème, confirmée ici (Kelly *et al.*, 2001; Olliaro et Yuthavong, 1999). Cette interaction est constante compte tenu que la fluorescence du mélange CQ+HEM ne change pas significativement tout au long de l'essai (Figure 48) et les valeurs d'UFR sont basses (Figure 47).

La fluorescence de la drogue augmente de façon significative en ajoutant l'OPA, car dans les conditions de l'essai il y a une interaction drogue-OPA (Figure 47). La CQ+OPA montre une fluorescence avec des valeurs d'UFR autour de 800 ce qui correspond approximativement à moins de 10 % de la fluorescence obtenue avec le GSH et CQ+GSH et autour de 13 % par rapport au GSH+HEM et à la CQ+GSH+HEM espèces comparées dans l'essai; cette fluorescence n'affecte pas significativement le résultat du test.

Le contrôle GSH (Figure 47), présente un comportement normal dans le cas de la CQ car il n'y a pas d'interactions avec le GSH qui puisse affecter le résultat de l'essai.

La Figure 49 présente une diminution de la fluorescence plus grande pour le contrôle (GSH+HEM) par rapport à l'échantillon (CQ+GSH+HEM). Le pourcentage de GSH restant montre un taux inférieur de dégradation quand la CQ est présente; car cette drogue maintient une plus grande concentration de GSH dans le milieu réactionnel, en réduisant probablement son oxydation en GSSG. Cette drogue a été aussi reportée comme étant inhibitrice du shunt d'hexose monophosphate ce qui, avec nos résultats, confirme la très bonne activité de la CQ sur cette cible pharmacologique (Famin et Ginsburg 2003).

f. Doxycycline

Les valeurs d'UFR de la drogue avec le GSH (DOX+GSH) sont inférieures par rapport au GSH seul, aussi bien à t=0 min qu'à t=30 min. Cela montre une interaction du GSH avec la DOX, probablement par le biais des groupements hydroxyle ou amine primaire présents sur la DOX. Cette interaction donne lieu à une diminution d'environ 30 % de la fluorescence. Cependant la haute variabilité des données fait penser à une interaction non constante (Figure 50). Les contrôles hème et OPA (Figure 50) montrent un comportement normal dans le cas de la DOX car il n'y a pas d'interaction avec l'hème et l'OPA qui puisse affecter le résultat de l'essai.

La Figure 51 présente une diminution de la fluorescence similaire pour le contrôle (GSH+HEM) par rapport à l'échantillon (DOX+GSH+HEM). Le pourcentage de GSH restant montre qu'il n'existe pas de différence significative car le taux de dégradation n'est pas inférieur quand la DOX est présente; cette drogue ne maintient donc pas une plus grande concentration de GSH dans le milieu réactionnel.

g. Mefloquine

Tous les contrôles présentent un comportement normal dans le cas de la MEF car, malgré le groupe hydroxyle de la MEF, il n'existe pas d'interaction importante qui affecte le résultat de l'essai Figure 52.

La Figure 53 présente une diminution de la fluorescence plus grande pour le contrôle (GSH+HEM) par rapport à l'échantillon (MEF+GSH+HEM). Le pourcentage de GSH restant montre, malgré la variabilité des données, ce taux inférieur de

dégradation quand la MEF est présente; car cette drogue maintient une plus grande concentration de GSH dans le milieu réactionnel, en réduisant probablement son oxydation en GSSG. Il a été reporté que la MEF n'inhibe pas la dégradation de l'hème par le GSH quand l'hème est liée aux protéines membranaires, mais il y a inhibition quand l'hème est en solution. Notre essai montre effectivement une inhibition de la dégradation de l'hème en solution (Deharo *et al.*, 2003 ; Famin *et al.*, 1999).

h. Primaquine

Les valeurs d'UFR de la drogue avec le GSH (PRI+GSH) sont significativement inférieures par rapport au GSH seul, tant à t=0 min comme à t=30 min (Figure 54). Ceci montre une possible interaction du GSH avec la PRI, probablement par le biais du groupe amine primaire de la PRI. Cette interaction donne lieu à une diminution d'environ 55 % de la fluorescence ce qui empêche de pouvoir obtenir des résultats fiables Figure 54.

La grande variabilité des données fait penser en une interaction non constante tout au long de l'essai.

Les contrôles hème et OPA ont un comportement normal dans le cas de la PRI car il n'a pas d'interactions avec l'hème et l'OPA qui peut affecter le résultat de l'essai (Figure 54). La Figure 55 présente des valeurs étranges par rapport aux cinétiques de diminution de la fluorescence; les valeurs pour le contrôle (GSH+HEM) sont significativement supérieures à celles obtenues avec l'échantillon (PRI+GSH+HEM), tant à t=0 min comme à t=30 min. Il y a donc une importante interaction quand la PRI est présente. Cependant les données de pourcentage de GSH restant, montrent une variabilité énorme qui ne permet pas de conclure sur l'activité de la PRI.

Le comportement atypique des valeurs d'UFR dans l'essai, probablement dues aux interactions des amines primaires de la PRIM, ne permet pas de conclure sur l'activité de la PRIM sur cette cible pharmacologique.

i. Pyrimethamine

Tous les contrôles présentent un comportement normal dans le cas de la PYR (Figure 56). Il n'existe pas d'interaction importante qui affecte le résultat de l'essai. Bien que la PYR ait deux groupes amine primaires, ils sont proches des deux

anneaux aromatiques provoquant un encombrement spatial qui peut limiter sa réaction avec le GSH et empêcher une interaction (Figure 7). Toutefois la grande variabilité des données fait penser à une interaction non constante.

La Figure 57 présente une diminution de fluorescence similaire pour le contrôle (GSH+HEM) et l'échantillon (PYR+GSH+HEM). De même, les pourcentages de GSH restant après 30 min ne sont pas significativement différents; car cette drogue ne maintient pas une plus grande concentration de GSH dans le milieu réactionnel. Par ailleurs le pourcentage de GSH restant montre une grande variabilité. Il est donc difficile de conclure sur l'activité de la drogue sur cette cible pharmacologique.

Ce résultat concorde avec le mécanisme d'action proposé pour la PYR qui est l'inhibition compétitive de la dihydrofolate réductase (Olliaro, 2001; Sibley *et al.*, 2001) et démontre la capacité de l'essaie à discriminer des drogues qui n'agissent pas sur la cible pharmacologique de la dégradation de l'hème par GSH.

j. Quinine

La fluorescence de la Q a été la plus élevée parmi les drogues étudiées atteignant 28% de la valeur de référence GSH+HEM; cette valeur d'UFR ne change pas de façon importante tout au long de l'essai car cette fluorescence n'affecte pas significativement le résultat du test (Figure 58).

Les valeurs d'UFR de la drogue avec le GSH (Q+GSH) par rapport au GSH seul, tant à t=0 min comme à t=30 min, présentent de petites différences (non significatives) qui peuvent être supérieures à la dégradation normale du GSH, mais ces différences n'affectent pas le résultat de l'essai (Figure 58).

Il y a une variation significative de la fluorescence de l'hème par rapport à l'échantillon drogue-hème. La Q est connue pour son interaction avec l'hème, ce qui est confirmé par ces résultats (Olliaro et Yuthavong, 1999; Kelly *et al.*, 2001; Pashynska *et al.*, 2004). Cette interaction est constante puisque la fluorescence de Q+HEM ne change pas significativement tout au long de l'essai et les valeurs d'UFR sont basses n'affectant pas le résultat de l'essai (Figure 59). Dans les conditions de l'essai, il n'y a pas d'interaction drogue-OPA (Figure 58). La Figure 60 présente une diminution de la fluorescence plus grande pour le contrôle (GSH+HEM) que pour l'échantillon (Q+GSH+HEM). Le pourcentage de GSH restant montre ce taux inférieur de dégradation quand la Q est présente; car cette drogue maintient une plus grande concentration de GSH dans le milieu réactionnel, en réduisant probablement

son oxydation en GSSG. Comme cela a été reporté la Q n'inhibe pas la dégradation de l'hème par le GSH quand l'hème est fixée aux protéines membranaires mais il y a inhibition quand l'hème est en solution. Notre essai donne une information concernant l'inhibition de la dégradation de l'hème en solution mais pas dans les autres conditions. C'est une autre limitante de notre test (Famin *et al.*, 1999 ; Deharo *et al.*, 2003).

1.3. Résultats généraux d'activité des drogues

La Figure 74 présente les pourcentages de GSH restant après 30 min d'incubation pour les drogues, par rapport au contrôle (GSH+HEM, 47+/-6 %, moyenne de 8 essais). Les drogues AMO, ART, BM, CQ, MEF et Q ont donné lieu à des pourcentages de GSH restant après 30 min significativement supérieurs (niveau p de signification < 0,001) au contrôle (Tableau 13), donc sont actives sur cette cible pharmacologique, malgré la possible interaction déjà reportée pour l'AMO. Ces drogues maintiennent une plus grande concentration de GSH dans le milieu réactionnel, en réduisant probablement son oxydation en GSSG.

Pour l'ATO et la PYR, les valeurs ne sont pas significativement différentes du contrôle (Tableau 13) donc elles ne présentent pas d'activité sur cette cible pharmacologique. Cette observation est en accord avec le fait que ces drogues agissent sur la chaîne de transfert des électrons de la mitochondrie et l'inhibition compétitive de la dihydrofolate réductase respectivement. Ceci démontre la capacité de l'essai de discriminer des drogues qui n'agissent pas sur la cible pharmacologique de la dégradation de l'hème par le GSH.

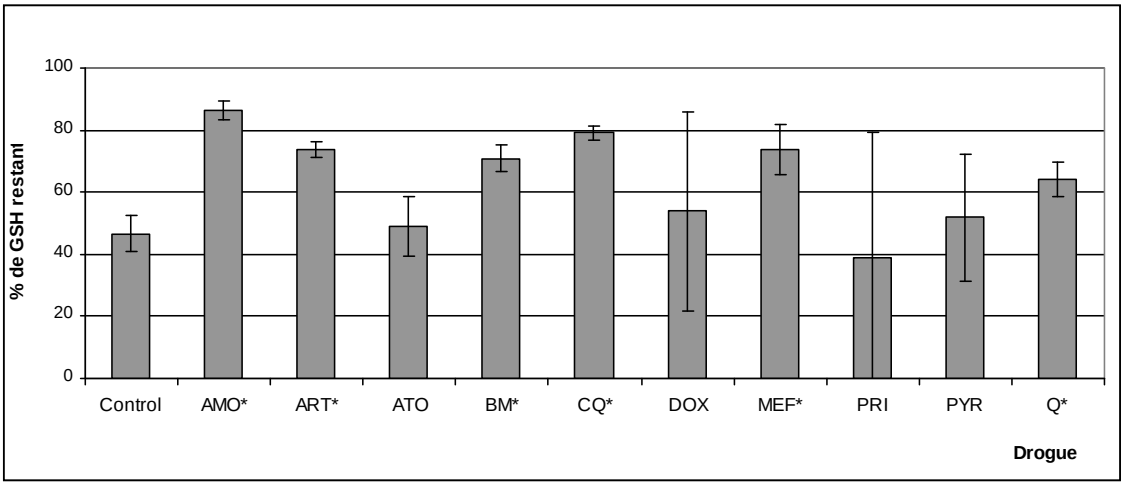


Figure 74. *Pourcentage de GSH restant après 30 min pour chaque drogue testées* * = niveau p de signification < 0,001*.*

Les molécules avec des groupes hydroxyle (AMO, ATO, DOX, MEF et Q) ou des amines primaires (DOX, PRI et PYR) peuvent interagir avec le groupe acide carboxylique du GSH. Cette interaction est plus importante avec le groupement amine primaire et moindre pour l'hydroxyle, et dépend aussi de l'encombrement spatial de la molécule. Dans nos résultats, l'interaction a été constante tout au long de l'essai et l'interférence de fluorescence faible, n'affectant pas le résultat de l'essai (AMO, ATO, MEF et Q).

Lorsque des interférences fortes sont détectées dans le cadre des contrôles, elles s'accompagnent d'une grande variabilité des résultats et dans le cas de la DOX et de la PRI elles ne permettent pas de conclure (Tableau 13).

Traitement	niveau p de signification
AMO	< 0,0001
ART	< 0,0001
ATO	0,6865
BM	0,0001
CQ	< 0,0001
DOX	0,5339
MEF	0,0002
PRI	0,5612
PYR	0,5117
Q	0,0011
BM+ATO	0,0009
BM+CQ	0,0042
BM+Q	0,0015

Tableau 13. *Niveau p de signification pour l'essai d'activité de drogues sur la dégradation de l'hème dépendante de GSH.*

1.4. Combinaisons des drogues

Nous avons étudié l'activité de combinaisons de drogues sur l'interaction GSH-Heme, par rapport aux drogues seules.

La Figure 75 présente les pourcentages de GSH restants après 30 min d'incubation pour les drogues seules et les combinaisons, par rapport au contrôle (GSH+HEM, moyenne de 8 essais).

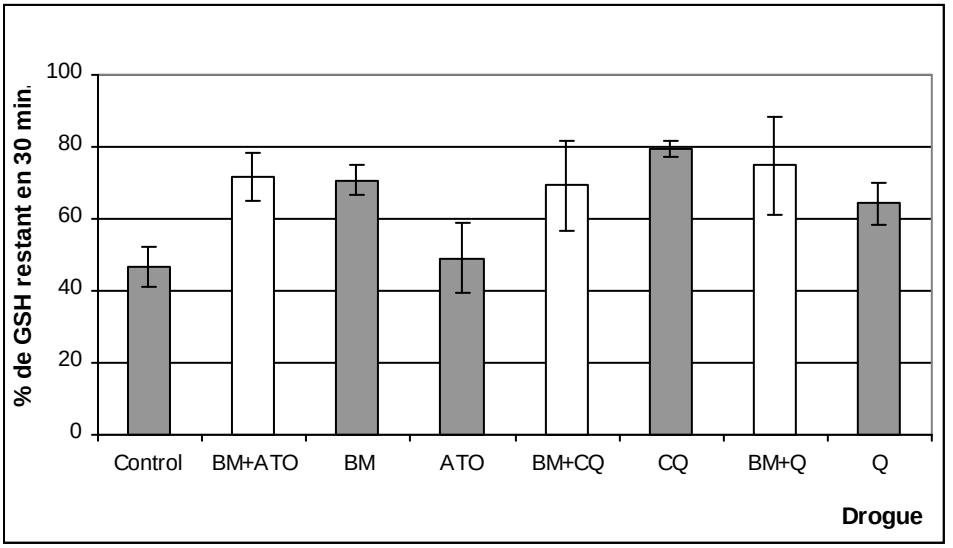


Figure 75. *Pourcentage de GSH restant après 30 min de combinaisons de drogues par rapport aux drogues seules.* Moyenne+/- Ecartype 2-3 essais.

a. Combinaison BM+ATO

La combinaison BM+ATO préserve 72+/-7 % de GSH au bout de 30 min, cette valeur est très similaire à celle obtenue avec le BM seul (71+/-4 %) donc, comme prévu, la combinaison avec l'ATO n'apporte pas de bénéfice à l'activité de BM.

b. Combinaison BM+CQ

La combinaison BM+CQ a donné lieu à 69+/-12 % de GSH restants après 30 min, cette valeur n'est pas significativement différente de celle obtenue avec le BM seul (71+/-4 %) ni de celle obtenue avec la CQ seule (79+/-2 %) donc la combinaison de BM avec la CQ n'apporte pas des bénéfices sur l'activité des drogues individuelles.

c. Combinaison BM+Q

La combinaison BM+Q a donné lieu à 75+/-14 % de GSH restants après 30 min, cette valeur n'est pas significativement différente de celle obtenue avec le BM seul (71+/-4 %), ni à celle obtenue avec la Q seule (64+/-6 %) ; donc la combinaison du BM avec la Q n'apporte pas de bénéfice sur l'activité des drogues seules, dans ce test.

Il faut souligner la variabilité plus élevée quand on évalue des combinaisons par rapport aux drogues seules.

2. LES INTERACTIONS PHYSICO-CHIMIQUES DROGUE-HEME

Plusieurs drogues agissent grâce à l'interférence dans le processus d'élimination de l'hème, comme cela a été décrit plus haut. La liaison de la CQ et d'autres antipaludiques (Q, AMO, MEF, Artésunate, etc.) avec l'hème a été décrite par plusieurs auteurs (Adams *et al.*, 1996; Egan *et al.*, 1997; Wright *et al.*, 2001).

Afin d'évaluer préliminairement la possible interaction physico-chimique directe entre le BM et l'hème, susceptible de donner lieu à une interférence dans l'élimination de l'hème, nous avons étudié par spectrométrie UV-Vis, par CCM et par spectrométrie de Masse la présence et la magnitude de genre d'interaction.

2.1. Essai de fixation à l'hémozoïne par spectrophotométrie UV VIS

Dans le but d'étudier l'action directe du BM sur l'hème, nous avons suivi les éventuelles perturbations sur le spectre UV-Vis de l'hème après addition de BM car, la formation de complexes drogue-hème donne lieu à des changements de son spectre d'absorption (Kelly *et al.*, 2001; Wright *et al.*, 2001; Huy *et al.*, 2002).

Bien qu'il y ait une petite diminution de l'absorbance à des concentrations de BM comprises entre 3,1 et 15,6 µM, cette diminution est négligeable à 31,3 et 1,5 µM (Figure 61).

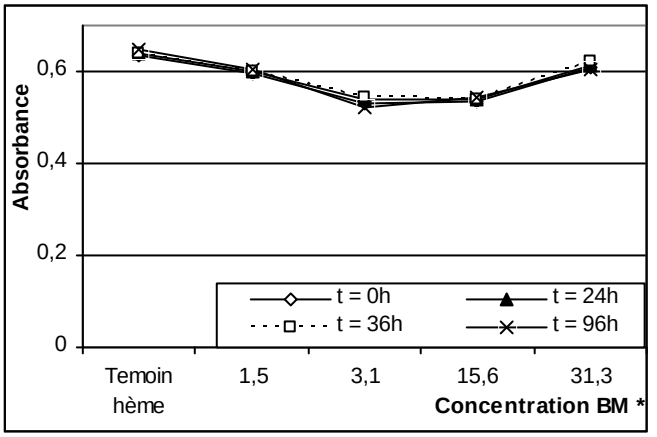


Figure 76. *Absorbance des mélanges hème–BM à 400 nm et à des différents temps d'incubation.* * µM.

Pour évaluer l'effet de l'incubation à 37°C pendant différents temps d'incubations nous avons fait des lectures d'absorbance à 0, 24, 36 et 96 h (Figure 76). Il n'y a pas de différences par rapport à l'absorbance des différentes solutions jusqu'à 96 h d'incubation.

À la longueur d'onde correspondant à la plus haute absorbance du BM on observe que l'absorbance et la concentration sont directement proportionnelles (Figure 62, gauche). Nous avons optimisé la quantification à cette longueur d'onde comme outil de contrôle qualité des préparations employées. De plus, nous avons constaté qu'après les différents temps d'incubation, il n'y a pas de différences importantes d'absorbance des solutions, ce qui démontre la stabilité des solutions de BM dans les conditions de l'essai (Figure 62, à droite).

L'évaluation par UV, à 400 nm (hémine), ne montre pas de changements dans l'absorption des mélanges (changements représentatifs d'éventuelles perturbations sur le spectre de l'hème et indicatifs d'interaction entre la drogue et l'hème), ni même après 96 heures à 37°C. Par conséquent, en UV-Vis on ne trouve aucun type d'interaction entre le MB et l'hémine (dissoute dans le Méthanol , où prédomine le monomère).

2.2. Essai de fixation à l'hémozoïne par chromatographie sur couches minces CCM

Afin d'évaluer la présence d'interactions fortes de type covalentes du BM avec l'hème nous avons analysé par CCM la présence de tâches indicatives de

complexes moléculaires de l'hème conséquence de l'addition du BM comme indicatif d'interaction entre la drogue et l'hème. La tâche correspondant à la migration de l'hème seule à 10 µM (Témoin hème) a une distance de migration très semblable à celle obtenue avec des solutions qui contiennent le mélange BM+hème quelle que soit la longueur d'onde (Figures 63 – 65). Robert (2001 et 2002) a montré par CCM, l'interaction covalente de l'artemisinine avec l'hème. Les CCM ne montrent aucune tâche correspondant à un complexe entre le BM el l'hème ; donc il n'y a pas d'interaction forte de type covalente.

2.3. Essai de fixation à l'hémozoïne par spectrométrie de masses

Pour mettre en évidence des complexes non-covalents formés *in vitro* entre le Fe(III)-hème et le BM comme système modèle pour l'interaction qui peut se produire *in vivo*, nous avons fait appel à la spectrométrie de masse d'ionisation electrospray (ESI-MS) qui est un outil rapide, sensible et fortement sélectif pour sonder les interactions non covalentes.

Les forces d'union relatives entre les drogues et l'hème ont été évaluées en utilisant la dissociation induite par collision de basse énergie qui peut transférer des ensembles non-covalents en solution, intacts dans une phase gazeuse. Cette approche a été utilisée dans la détermination de la relation structure-activité de certains agents antipaludiques (Wright *et al.*, 2001; Pashynska *et al.*, 2004).

Les conditions de l'essai ont été adaptées selon Pashynska (2004). La Figure 66 présente le spectre de masse ESI obtenu avec le mélange BM-hème (1 :1). Au début on observe la masse cationique correspondant au BM+ (284,05 Da), puis il y a la masse correspondant à l'hème Fp+ (616 Da) et au [Fp:Méthanol]+ (648 Da). L'évaluation par spectrométrie de masse ne montre pas d'adduits correspondants à [Fp:BM]+ (900 Da). Pashynska (2004) a montré par spectrométrie de masse, l'interaction non covalente de la quinine (324 Da) avec l'hème [Fp:Q]+ (940 Da) et avec le dimère d'hème [(2Fp-H):Q]+ (1556 Da). Par spectrométrie de masse, on ne trouve aucun type d'interaction entre le BM et l'hème, donc il n'existe pas d'évidence d'unions faibles.

L'analyse conjointe des essais effectués, UV-Vis, CCM et Masse, indique qu'il n'existe pas d'interaction directe, soit covalente ou soit faible, entre le BM et l'hème.

V. RÉSUMÉ - CONCLUSION

Avec l'apparition et le développement de résistances aux antipaludiques d'utilisation courante, il est important de trouver de nouveaux composés actifs contre *Plasmodium*. Cette parasitose s'adresse essentiellement à des populations non-solvables. Il est donc important de proposer des alternatives thérapeutiques efficaces et bon marché.

Nous nous sommes orientés vers l'étude de molécules susceptibles d'être rapidement proposables dans le cadre de la mise au point de traitements antipaludiques. C'est le cas du chlorure de méthylthioninium (plus connu sous le nom de bleu de méthylène) qui, avec la quinine, servirent de point de départ structural pour le développement des 8-aminoquinoline (pamaquine) et 9-aminoacridine mepacrine (quinacrine) au début du XXème siècle. Atamna *et al.* en 1996 avaient déjà suggéré que le bleu de méthylène devrait être reconsidéré dans le traitement du paludisme. En effet, il présente une remarquable activité antipaludique *in vitro* et *in vivo*. Il est aussi très sélectif et n'a pas de résistance croisée avec la chloroquine.

Sur la culture de *P. falciparum in vitro*; nous avons déterminé la CI_{50} du BM ainsi que celle des autres antipaludiques classiques sur les souches F32-Tanzania, HB3-Honduras, FcM29-Cameroon et FcB1-Colombia. Nous avons ainsi pu montrer que le BM est très actif sur des souches d'origines géographiques et de chloroquino-sensibilités très différentes.

L'étude du stade intraérythrocytaire sensible a montré que les stades jeunes de développement parasitaire (anneaux et jeunes trophozoïtes) sont les plus sensibles à l'action du BM.

L'étude des interactions avec les antipaludiques classiques, nous a permis de définir des associations médicamenteuses plus adaptées à la mise au point d'une formulation efficace et bon marché: antagonisme avec amodiaquine ; antagonisme / additivité avec atovaquone, doxycycline, pyrimethamine ; additivité / pas d'interaction avec artemether, chloroquine, mefloquine, primaquine et synergie avec la quinine.

L'étude de l'activité antipaludique *in vivo* montre que le BM présente une bonne activité sur le cycle érythrocytaire de différentes souches de *Plasmodium* de souris. Nous avons aussi montré qu'il n'y a pas d'activité du BM sur les stades hépatiques de *P. yoelii yoelii*.

Sur la lignée cellulaire BJAB, le BM a un Index de Sélectivité du même ordre que celui de la CQ sur plusieurs souches de *P. falciparum* de différents niveaux de sensibilité à la CQ et de différentes origines géographiques. Les deux drogues ont

des IS compris entre 19 et 319, de niveaux similaires à ceux qui sont rapportés dans la littérature.

Dans les essais *in vivo* d'activité antipaludique avec une administration de BM pendant 4 jours consécutifs, et compte tenu de la symptomatologie et mortalité propres de l'infection palustre de l'essai, nous n'avons pas détecté de signes de toxicité aiguë jusqu'à 50 mg/Kg.

La mise au point d'un nouveau test de mesure d'interaction entre le BM et l'association hème-GSH, nous a également permis de préciser le mécanisme d'action du BM : il inhibe la dégradation de l'hème par le GSH.

Nous avons également étudié l'impact direct du BM sur l'hème par spectrométrie UV - Vis, par CCM et par spectrométrie de masse et avons montré qu'il n'y a pas de liaison entre le BM et l'hème.

Ce travail a nécessité un nombre considérable d'essais de paillasse au sein de 3 laboratoires différents. Cette formation est donc de grande importance pour acquisition des outils nécessaires pour mon travail futur de chercheur et d'enseignant à l'Universidad Nacional de Colombia.

En conclusion, nous avons apporté des informations nouvelles en ce qui concerne les interactions du bleu de méthylène avec des molécules classiquement utilisées en thérapeutique, nous avons déterminé le stade sensible de *P. falciparum* au bleu de méthylène et nous avons mis au point une nouvelle technique pour mesurer la transformation de l'hème par GSH et l'activité des drogues sur cette transformation.

BIBLIOGRAPHIE

Adams PA, Berman PAM, Egan TJ, Marsh PJ, Silver J. 1996. The iron environment in heme and heme-antimalarial complexes of pharmacological interest. *J. Inorg. Biochem.* **63:** 69-77.

Akoachere M, Buchholz K, Fischer E, Burhenne J, Haefeli WE, Schirmer RH, *et al.* 2005. *In vitro* assessment of methylene blue on chloroquine-sensitive and resistant *Plasmodium falciparum* strains reveals synergistic action with artemisinins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49(11):** 4592-97.

Antoine FR, Wei CI, Littell RC, Marshall MR. 1999. HPLC method for analysis of free amino acids in fish using o-phthaldialdehyde precolumn derivatization. *J. Agric. Food Chem.* **47:** 5100-07.

Arese P, Schwarzer E. 1997. Malarial pigment (haemozoin): a very active “inert” substance. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **91:** 501-16.

Arnot DE, Gull K. 1998. The Plasmodium cell-cycle: facts and questions. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **92:** 361-65.

Atamna H, Ginsburg H. 1995. Heme degradation in the presence of glutathione. *J. Biol. Chem.* **270(42):** 24876-83.

Atamna H, Krugliak M, Shalmiev G, Deharo E, Pescarmona G, Ginsburg H. 1996. Mode of antimalarial effect of methylene blue and some of its analogues on *Plasmodium falciparum* in culture and their inhibition of *P. vinckei petteri* and *P. yoelii nigeriensis in vivo*. *Biochem. Pharmacol.* **51:** 693-700.

Atamna H, Ginsburg H. 1997. The malaria parasite supplies glutathione to its host cell; Investigation of glutathione transport and metabolism in human erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. *Eur. J. Biochern.* **250:** 670-79.

Baird JK. 2005. Effectiveness of antimalarial drugs. *N. Engl. J. Med.* **352(15):** 1565-77.

Becker K, Rahlfs S, Nickel C, Schirmer RH. 2003. Glutathione functions and metabolism in the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Biol. Chem.* **384:** 551-66.

Benoit-Vical F, Valentin A, Cournac V, Pélissier Y, Mallié M, Bastide JM. 1998. *In vitro* antiplasmodial activity of stem and root extracts of *Nauclea latifolia* S.M. (Rubiaceae). *J. Ethnopharmacol.* **61:** 173-78.

Benoit-Vical F, Robert A, Meunier B. 2000. *In vitro* and *in vivo* potentiation of artemisinin and synthetic endoperoxide antimalarial drugs by metalloporphyrins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44(10):** 2836-41.

Berenbaum MC. 1978. A method for testing for synergy with any number of agents. *J. Infect. Dis.* **137(2):** 122-30.

Bertani S. 2006. Simalikalactone D, molécule issue de la pharmacopée traditionnelle amazonienne : activité antipaludique et mécanisme d’action. Thèse de Doctorat de l’Université Pierre & Marie Curie – Paris 6. École Doctorale B2M

Bhasin VK, Trager W. 1984. Gametocyte-forming and non-gametocyte-forming clones of *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg.* **33(4):** 534-7.

Bwijo B, Hassan MA, Abbas N, Eriksson Ö. Djörkman A. 1997. Repetitive dosing of artemisinin and quinine against *Plasmodium falciparum in vitro*: a simulation of the *in vivo* pharmacokinetics. *Acta Trop.* **65:** 11-22

Caillard V, Beaute-Lafitte A, Chabaud AG, Landau I. 1992. *Plasmodium vinckei petteri*: identification of the stages sensitive to arteether. *Exp. Parasitol.* **75(4):** 449-56.

Camera E, Rinaldi M, Briganti S, Picardo M, Fanali S. 2001. Simultaneus determination of resuced and oxidized glutathione in peripheral blood

mononuclear cells by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr.* **757:** 69-78.

Canfield CJ, Pudney M, Gutteridge WE. 1995. Interactions of atovaquone with other antimalarial drugs against *Plasmodium falciparum in vitro*. *Exp. Parasitol.* **80:** 373-81.

Cereser C, Guichard J, Drai J, Bannier E, Garcia I, Boget S *et al.* 2001. Quantitation of reduced and total glutathione at the femtomole level by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: application to red blood cells and cultured fibroblasts. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **752(1):** 123-32.

Chimanuka B, Francois G, Timperman G, Heyden YV, Holenz J, Plaizier-Vercammen J, Bringmann G. 2001. A comparison of the stage-specific efficacy of chloroquine, artemether and dioncophylline B against the rodent malaria parasite *Plasmodium chabaudi chabaudi in vivo*. *Parasitol. Res.* **87(10):** 795-803.

Cohn VH, Lyle J. 1966. A fluorometric assay for glutathione. *Anal. Biochem.* **14(3):** 434-40.

De Jongh SE. 1961. Isoboles. In: Quantitative methods in pharmacology. Elsevier, Amsterdam. pp. 101-339.

Deharo E. 2000. Première deuxième et troisième parties. In: Deharo, E., Gautret, Ph., Muñoz, V., Sauvain, M., Técnicas de laboratorio para la selección de sustancias antimaláricas, Primera edición, IRD-CYTED, La Paz, pp187.

Deharo E, Barkanb D, Krugliakc M, Golenserb J, Ginsburg H. 2003. Potentiation of the antimalarial action of chloroquine in rodent malaria by drugs known to reduce cellular glutathione levels. *Biochem. Pharmacol.* **66:** 809-17.

Desjardins RE, Canfield CJ, Haynes JD, Chulay JD. 1979. Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob. Agents Chemother.* **16(6):** 710-18.

Diller RA, Riepl HM, Rose O, Frias C, Henze G, Prokop a. 2005. Síntesis of demethylxanthohumol, a new potent apoptosis-inducing agent from hops. *Chem. Biodivers.* **2:** 1331-37.

Eckstein-Ludwig U, Webb RJ, van Goethem LDA, East JM, Lee AG, Kimura M, O'Neill PM, Bray PG, Ward SA, Krishna S. 2003. Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature*. **424:** 957-61.

Egan TJ, Mavuso WW, Ross DC, Marques HM. 1997. Thermodynamic factors controlling the interaction of quinoline antimalarial drugs with ferriprotoporphyrin IX. *J. Inorg. Biochem.* **68:** 137-45.

Famin O, Ginsburg H. 2003. The treatment of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes with chloroquine leads to accumulation of ferriprotoporphyrin IX bound to particular parasite proteins and to the inhibition of the parasite's 6-phosphogluconate dehydrogenase. *Parasite.* **10(1):** 39-50.

Famin O, Krugliak M, Ginsburg H. 1999. Kinetics of inhibition of glutathione-mediated degradation of ferriprotoporphyrin IX by antimalarial drugs. *Biochem. Pharmacol.* **58:** 59-68.

Färber PM, Arscott LD, Williams CH, Becker K, Schirmer RH. 1998. Recombinant *Plasmodium falciparum* glutathione reductase is inhibited by the antimalarial dye methylene blue. *FEBS Lett.* **422:** 311-14.

Fillaux J. 2006. Entrevue Personnelle pour analyse statistique. MD, Laboratoire de Parasitologie, CHU Rangueil, Toulouse, France.

Fivelman QL, Adagu IS, Warhurst DC. 2004. Modified fixed-ratio isobologram method for studying *in vitro* interactions between atovaquone and proguanil or

dihydroartemisinin against drug-resistant strains of *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48(11):** 4097-4102.

Francis SE, Gluzman IY, Oksman A, Banerjee D, Goldberg DE. 1996. Characterization of native falcipain, an enzyme involved in *Plasmodium falciparum* hemoglobin degradation. *Mol. Biochem. Parasitol.* **83:** 189.

Francis SE, Banerjee R, Goldberg DE. 1997. Biosynthesis and maturation of the malaria aspartic hemoglobinases plasmepsins I and II. *J. Biol Chem.* **272:** 14961.

Garavito G, Arteaga L, Acebey L. 2002. La biocristalización del heme como una potencial diana farmacológica en el desarrollo de fármacos para el tratamiento de la malaria. *Rev. Col. Cien Quím. Farm.* **31:** 85-95.

Garavito G, 2003. Estandarización de dos modelos de actividad antimalárica como herramientas para la evaluación farmacológica de sustancias o extractos de origen vegetal, Thèse MSc, Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Farmacia.

Geary TG, Divo AA, Jensen JB. 1989. Stage specific actions of antimalarial drugs on *Plasmodium falciparum* in culture. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **40(3):** 240-4.

Gensini GF, Conti AA, Lippi D. 2006. The 150th anniversary of the birth of Paul Ehrlich, chemotherapy pioneer. *J Infect.* [Epub ahead of print].

Ginsburg H, Famin O, Zhang J, Krugliak M. 1998. Inhibition of glutathione-dependent degradation of heme by chloroquine and amodiaquine as a possible basis for their antimalarial mode of action. *Biochem. Pharmacol.* **56:** 1305-13.

Ginsburg H, Golenser J. 2003. Glutathione is involved in the antimalarial action of chloroquine and its modulation affects drug sensitivity of human and murine species of Plasmodium. *Redox Rep.* **(5):** 276-9.

Guttmann P, Ehrlich P. 1891. Ueber die Wirkung des Methylenblau bei Malaria. *Berlin Klin Wochenschr*. **28:** 953-6.

Hejtmancik MR, Ryan MJ, Toft JD, Persing RL, Kurtz PJ, Chhabra RS. 2002. Hematological effects in F344 rats and B6C3F1 mice during the 13-week gavage toxicity study of methylene blue trihydrate. *Toxicol. Sci.* **65:** 126-34.

Hissin PJ, Hilf R. 1976. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal. Biochem.* **74:** 214-26.

Huy NT, Kamei K, Yamamoto T, Kondo Y, Kanaori K, Takano R, Tajima K, Hara S. 2002. Clotrimazole binds to heme and enhances heme-dependent hemolysis. *J. Biol. Chem.* **277(6):** 4152-58.

Institut Pasteur Centre National de Référence de la Chimiorésistance du Paludisme aux Antilles – Guyane CNRCP. 2003. Protocole du test in vitro de chimiosensibilité aux antipaludéens. Institut Pasteur de la Guyane.

Karbwang J, Back DJ, Bunnag D. 1988. Breckenridge A.M. A comparison of the pharmacokinetics of mefloquine in healthy Thai volunteers and in Thai patients with falciparum malaria. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **35(6):** 677-80.

Keene JP, Land EJ, Swallow AJ. A pulse radiolysis study of methylene blue, In: Ebert M, Keene JP, Swallow AJ, Baxendale JH (Eds), Pulse Radiolysis, London, Academic Press, 1965, 227-44.

Kelly JX, Wintera R, Riscoea M, Peyton DH. 2001. A spectroscopic investigation of the binding interactions between 4,5-dihydroxyxanthone and heme. *J. Inorg. Biochem.* **86:** 617-25.

Kirszberg C, Rumjanek VM, Capella MA. 2005. Methylene blue is more toxic to erythroleukemic cells than to normal peripheral blood mononuclear cells: a possible use in chemotherapy, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **56(6):** 659.

Lambros C, Vanderberg JP. 1979. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J. Parasitol.* **65(3):**418-20.

Landau I, Gautret P. 1998. Animal models: Rodents. In: Malaria: Parasite Biology, Pathogenesis, and Protection. ASM Press, Washington, D.C. pp. 401-41.

Landau I. 2005. Entrevue personnelle. Chercheur au Muséum Nationale d'Histoire Naturelle (MNHN), Laboratoire de Parasitologie Comparée. Paris, décembre 2005 – janvier 2006.

Lebrun-Vignes B. 1999. Les antimalariques: pharmacologie, pharmacocinétique et toxicité chez l'adulte. *Méd. Mal. Infect.* **29(2):** 229-48.

Le-Bras J, Musset L, Clain J. 2006. Les résistances aux médicaments antipaludiques, antimalarial drug resistance. *Med. Mal. Infect.* **36:** 401-05.

Lelièvre J, Berry A, Benoit-Vical F. 2005. An alternative method for Plasmodium culture synchronization. *Exp. Parasitol.* **109:** 195-97.

Mandi G, Witte S, Meissner P, Coulibaly B, Mansmann U, Rengelshausen J, Schiek W, Jahn A, Sanon M, Wüst K, Walter-Sack I, Mikus G, Burhenne J, Riedel KD, Schirmer H, Kouyaté B, Müller O. 2005. Safety of the combination of chloroquine and methylene blue in healthy adult men with G6PD deficiency from rural Burkina Faso. *Trop. Med. Int. Health.* **10:** 32-38.

Mansor SM, Navaratnam V, Mohamad M, Hussein S, Kumar A, Jamaludin A, Wernsdorfer WH. 1989. Single dose kinetic study of the triple combination mefloquine/ sulphadoxine/ pyrimethamine (Fasimef) in healthy male volunteers. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **27(3):** 381-86.

Mariga ST, Gil JP, Wernsdorfer WH, Björkman A. 2005. Pharmacodynamic interactions of amodiaquine and its major metabolite desethylamodiaquine with artemisinin, quinine and atovaquone in *Plasmodium falciparum in vitro*. *Acta Trop.* **93:** 221-31.

Mather MW, Darrouzet E, Valkova-Valchanova M, Cooley JW, McIntosh MT, Daldal F, Vaidya AB. 2005. Uncovering the molecular mode of action of the antimalarial drug atovaquone using a bacterial system. *J. Biol. Chem.* **280(29):** 27458-65.

Meierjohann S, Walter RD, Müller S. 2002. Regulation of intracellular glutathione levels in erythrocytes infected with chloroquine-sensitive and chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. *Biochem. J.* **368(Pt 3):** 761-68.

Meissner PE, Mandi G, Witte S, Coulibaly B, Mansmann U, Rengelshausen J, Schiek W, Jahn A, Sanon M, Tapsoba T, Walter-Sack I, Mikus G, Burhenne J, Riedel KD, Schirmer H, Kouyaté B, Mueller O. 2005. Safety of the methylene blue plus chloroquine combination in the treatment of uncomplicated falciparum malaria in young children of Burkina Faso. *Malar. J.* **4:** 45.

Meissner PE, Mandi G, Coulibaly B, Witte S, Tapsoba T, Mansmann U, Rengelshausen J, Schiek W, Jahn A, Walter-Sack I, Mikus G, Burhenne J, Riedel KD, Schirmer H, Kouyaté B, Mueller O. 2006. Methylene blue for malaria in Africa: results from a dose-finding study in combination with chloroquine. *Malar. J.* **5:** 84.

Menezes J, Leibold W, Klein G, Clements G. 1975. Establishment and characterization of an Epstein-Barr virus (EBC)-negative lymphoblastoid B cell line (BJA-B) from an exceptional, EBV-genome-negative African Burkitt's lymphoma. *Biomedicine* **22:** 276-284.

Milton JS. Inferencias sobre la medida, In: E Milton JS. (Ed.), Estadística para biología y ciencias de la salud, Madrid, McGraw-Hill, 1998, 165-209.

Monamy V. 2000. Animal Experimentation: A Guide to the Issues. Cambridge University Press, Cambridge.

Mutabingwa TK. 2005. Artemisinin-based combination therapies (ACTs): Best hope for malaria treatment but inaccessible to the needy! *Acta Trop.* **95:** 305-15.

Neuschwander-Tetri BA, Roll FJ. 1989. Glutathione measurement by high-performance liquid chromatography separation and fluorometric detection of the glutathione-orthophthalaldehyde adduct. *Anal. Biochem.* **179:** 236-41.

Odds FC. 2003. Synergy, antagonism, and what the chequeboard puts between them. *J. Antimicrob. Chemother.* **52:** 1.

Ohrt C, Willingmyre GD, Lee P, Knirsch C, Milhous W. 2002. Assessment of azithromycin in combination with other antimalarial drugs against *Plasmodium falciparum in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46(8):** 2518-24.

Olliaro PL, Goldberg DE. 1995. The Plasmodium digestive vacuole: metabolic headquarters and choice drug target. *Parasitol. Today.* **11:** 294.

Olliaro PL, Yuthavong Y. 1999. An overview of chemotherapeutic targets for antimalarial drug discovery - phosphocholine cytidylyltransferase from *Plasmodium falciparum. Pharmacol. Ther.* **81(2):** 91-110.

Olliaro P. 2001. Mode of action and mechanisms of resistance for antimalarial drugs. *Phar. & Ther.* **89:** 207-19.

Pashynska VA, Heuvel HV, Claeys M, Kosevich MV. 2004. Characterization of noncovalent complexes of antimalarial agents of the artemisinin-type and Fe(III)-heme by electrospray mass spectrometry and collisional activation tandem mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **15:** 1181-90.

Peer D, Dekel Y, Melikhov D, Margalit R. 2004. Fluoxetine inhibits multidrug resistance extrusion pumps and enhances responses to chemotherapy in syngeneic and in human xenograft mouse tumor models. *Cancer Res.* **64:** 7562-69.

Perea-Sasiain J. 2003.Cien años del colorante de Giemsa. *Biomédica* **23:** 5-18.

Peter C. Hongwan D, Kupfer A, Lauterburg BH. 2000. Pharmacokinetics and organ distribution of intravenous and oral methylene blue. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **56(3):** 247-50.

Peters W. 1970. Chemotherapy and Drug Resistance in Malaria. Academic Press, Ltd. London. pp. 64-136.

Peters W, Robinson BL. 1999. Malaria. In: Zak O, Sande MA (Eds.), Handbook of animal models of infection", Academic Press, New York, ISBN 0127753907, p 758.

PlasmoDB, The Plasmodium Genome Resource. November 17th 2005 date de révision. Expression of Plasmodial glutathione reductase. http://www.plasmodb.org/.

Pottier R, Bonneau R, Joussot-Dubien J. 1975. pH-dependence of singlet oxygen production in aqueous solutions using toluidine blue as a photosensitizer. *Photochem. Photobiol.* **22:** 59-61.

Pupunat J. 2004. Les nouvelles molecules antipaludiques. Thèse de Doctorat d'Etat en Pharmacie de l'Université Paul Sabatier - Toulouse III. Faculté des Sciences Pharmaceutiques.

Ralaimazava P, Durand R, Godineau N, Keundjian A, Jezic Z, Pradines B, Bouchaud O, Le Bras J. Profil et évolution de la chimiosensibilité du paludisme d'importation à *Plasmodium falciparum* en France en 2000. *Eurosurveillance*. 2002. **7:** 113-18.

Ridley RG. 1997. Haemoglobin degradation and haem polymerization as antimalarial drug targets. *J. Pharm. Pharmacol.* **49:** 43.

Ridley RG. 2003. To kill a parasite. *Nature.* **424:** 887-89.

Ringwald P, Eboumbou ECM, Bickii J, Basco LK. 1999. *In vitro* activities of pyronaridine, alone and in combination with other antimalarial drugs, against *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43(6):** 1525-27.

Robert A, Cazelles J, Meunier B. 2001. Characterization of the alkylation product of heme by the antimalarial drug artemisinin. *Angewandte Chemie, International Edition.* **40:** 1954-57.

Robert A, Coppel Y, Meunier B. 2002. NMR characterization of covalent adducts obtained by alkylation of heme with the antimalarial drug artemisinin. *Inorganica Chimica Acta.* **339:** 488-96.

Rosenthal PJ. 1998. Proteases of malaria parasites: new targets for chemotherapy. *Emerg. Infect. Dis.* **4:** 49.

Russell WMS, Burch RL. 1959. The principles of humane experimental technique. Methuen and Co., London.

Scaduto RC. 1988. Dithiothreitol and amino acids interfere with the fluorometric determination of glutathione with orthophthaldehyde. *Anal. Biochem.* **174(1):** 265-70.

Schirmer RH, Coulibaly B, Stich A, Scheiwein M, Merkle H, Eubel J, Becker K, Becher H, Müller O, Zich T, Schiek W, Kouyaté B. 2003. Methylene blue as an antimalarial agent. *Redox Rep.* **8(5).**

Shute PG, Maryon M. 1966. Laboratory technics for the study of malaria. J.A. Churchill, London.

Sibley CH, Hyde JE, Sims PFG, Plowe CV, Kublin JG, Mberu EK, Cowman AF, Winstanley PA, Watkins WM, Nzila AM. 2001. Pyrimethamine–sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum*: what next? *TRENDS in Parasitol.* **17(12):** 582-88.

Silva AM, Lee AY, Gulnik SV, Majer P, Collins J, Bhat TN, Collins PJ, Cachau RE, Luker KE, Gluzman IY, Francis SE, Oksman A, Goldberg DE, Erickson JW. 1996. Structure and inhibition of plasmepsin II, a hemoglobin-degrading enzyme from *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93:** 10034.

Skinner TS, Manning LS, Johnston WA, Davis TME. 1996. *In vitro* stage-specific sensitivity of *Plasmodium falcipaum* to quinine and artemisinin drugs. *Int. J. Parasitol.* **26(5):** 519-25.

Steinitz M, Klein G. 1975. Comparison between growth characteristics of an Epstein-Barr virus (EBV)-genome-negative lymphoma line and its EBV-converted subline *in vitro*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **72(9):** 3518-20.

Taramelli D, Basilico N, De Palma AM, Sarasella M, Ferrante P, Mussoni L, Olliaro P. 1998. The effects of synthetic malaria pigment (β-haematin) on adhesion and interleukin 6 production by human endothelial cells, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **92(1):** 57-62.

Ter-Kuile F, White NJ, Holloway P, Pasvol G, Krishna S. 1993. *Plasmodium falciparum: in vitro* studies of the pharmacodynamic properties of drugs used for the treatment of severe malaria. *Exp. Parasitol.* **76(1):** 85-95.

Tewari M, Telford WG, Miller RA, Dixit VM. 1995. CrmA, a poxvirus-encoded serpin, inhibits cytotoxic T-lymphocyte-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* **270(39):** 22705-08.

Thurston JP. 1953. The chemotherapy of *Plasmodium berghei*. I. Resistance to drugs. *Parasitology*. **43:** 246-52.

Trager W, Jensen JB. 1976. Human malaria in continuous culture. *Science* **193:** 673-75.

Valentin A, Benoit-Vical F, Moulis C, Stanislas E, Mallié M, Fouraste I, *et al.* 1997. *In vitro* antimalarial activity of penduline, a bisbenzylisoquinoline from *Isopyrum thalictroides*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41(10):** 2305-07.

Valentin A. 2006. Entrevue personnelle. Professeur Université Paul Sabatier Toulouse III, Faculté des Sciences Pharmaceutiques. Toulouse, mars 2005 – mars 2006.

Vennerstrom JL, Makler MT, Angerhofer CK, Williams JA. 1995. Antimalarial dyes revisited: xanthenes, azines, oxazines, and thiazines. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39(12):** 2671-77.

Wainwright M, Amaral J. 2005. The phenothiazinium chromophore and the evolution of antimalarial drugs. *Trop. Med. Int. Health*. **10(6):** 501 -11.

Wen-Min W, Yan-Li Ch, Zili Z, Shu-Hua X, Yu-Lin W. 2003. Study on the mechanism of action of artemether against schistosomes: the identification of cysteine adducts of both carbon-centred free radicals derived from artemether. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13:** 1645-47.

Whitehead S, Peto TEA. 1990. Stage-dependent effect of deferoxamine on Growth of *Plasmodium falciparum In Vitro*. *Blood*. **76(6):** 1250-55.

Wright AD, Wang H, Gurrath M, König GM, Kocak G, Neumann G, Loria P, Foley M, Tilley L. 2001. Inhibition of heme detoxification processes underlies the antimalarial Activity of terpene isonitrile compounds from marine sponges. *J. Med. Chem.* **44:** 873-85.

Yayon A, Vande-Waa JA, Yayon M, Geary TG, Jensen JB. 1983. Stage-dependent effects of chloroquine on *Plasmodium falciparum in vitro*. J. Protozool. 30(4): 642-7.

Ye ZG, Li ZL, Li GQ, Fu XQ, Liu HP, Gao MX. 1983. Effects of qinghaosu and chloroquine on the ultrastructure of the erythrocytic stage of *P. falciparum* in continuous cultivation *in vitro*. *J. Tradit. Chin. Med.* **3(2):** 95-102.

Zhang Y, Asante KS, Jung A. 1986. Stage-dependent inhibition of chloroquine on *Plasmodium falciparum in vitro*. *J. Parasitol.* **72(6):** 830-6.

PUBLICATIONS

Les résultats exposés dans cette thèse ont été présentés dans les publications suivantes :

- Garavito G, Bertani S, Rincon J, Maurel S, Monje MC, Landau I, Valentin A, Deharo E. 2007. Blood schizontocidal activity of methylene blue in combination with antimalarials against *Plasmodium falciparum*. *Parasite.* **14(2):** 135-40.
- Garavito G, Monje MC, Maurel S, Valentin A, Nepveu F, Deharo E. 2007. A non-radiolabeled Heme-GSH interaction test for the screening of antimalarial compounds. *Experimental parasitology.* **116(3):** 311-13.

Autres publications réalisées durant la période de la thèse.

- Garavito G, Rincón J, Arteaga L, Hata Y, Bourdy G, Jiménez A, Pinzon R, Deharo E. 2006. Antimalarial activity of some colombian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology.* **107(3):** 460-62.
- Bertani S, Houël E, Stien D, Chevolot L, Jullian V, Garavito G, Bourdy G, Deharo E. 2006. Simalikalactone D is responsible for the antimalarial properties of an Amazonian remedy made with *Quassia amara* L. (Simaroubaceæ). *Journal of Ethnopharmacology.* **108(1):** 155-7.

ANNEXES

A1. Réactifs pour la culture de *P. falciparum*

Composition du Milieu de culture RPMI 1640 sans L-glutamine (Cambrex. Ref 12-167F).

	Composants	Concentration en mg/L
Acides aminés	Arg	200
	Asn	50
	Asp	20
	Cys	50
	Glu	20
	Gly	10
	His	15
	Pro	20
	IsoLeu	50
	LysHCl	40
	Met	15
	Phe	15
	Pro	20
	Ser	30
	Thr	20
	Trp	5
	Tyr	20
	Val	20
Sels inorganiques	$Ca(NO_3)_2,4H_2O$	100
	KCl	400
	$MgSO_4,7H_2O$	100
	NaCl	6000
	$Na_2HPO_4*7H_2O$	1512
Vitamines	D-Biotine	0,20
	Pantothénate de Ca	0,25
	Choline (HCl)	3
	Acide folique	1
	Inositol	35
	Nicotinamide	1
	Ac. p-aminobenzoïque	1
	Pyridoxine HCl	1
	Riboflavine	0,20
	Thiamine HCl	1
	Vitamine B12	0,01
Autres	Rouge de phénol	5
	D-Glucose	2000
	Glutathion (réduit)	1

Préparation du sérum humain pour la culture de P. falciparum

Les manipulations sont effectuées stérilement sous hotte de biosécurité et avec du matériel stérile. Les poches de sérum humains AB+ sont fournies par l'Etablissement Français du Sang à l'Hôpital de Rangueil, Toulouse. Le sérum est décomplémenté en le mettant au bain marie à 52 °C pendant ¾ d'heure. Le serum est aliquoté dans des tubes stériles de 50 ml qui sont immédiatement congelés à –20 °C en attendant leur utilisation pour servir à la préparation du milieu de culture de *P. falciparum*.

Préparation des hématies saines

Nous avons travaillé avec des globules rouges du groupe O+ fournis par l'Etablissement Français du Sang à l'Hôpital de Rangueil, Toulouse. Les globules rouges sont aliquotés dans des tubes stériles de 50 ml, lavés trois fois avec du milieu RPMI. Le dernier culot est repris dans du milieu RPMI de manière à avoir un hématocrite 50%. Les hématies sont conservées au réfrigérateur à +4°C, au maximum pendant de quinze jours.

A2. Méthodes pour la culture de *P. falciparum*

Culture de Plasmodium falciparum

Les manipulations sont effectuées stérilement sous hotte de biosécurité et avec du matériel stérile. Toutes les 24 h sont réalisés frottis et changement de milieu.

1. La culture est transvasée à un tube stérile de 14 ml à l'aide d'une pipette de 10 ml.
2. Prendre 100 µl de la culture et les placer dans un tube eppendorf pour évaluer la parasitémie. Faire un frottis et le colorer au Giemsa.
3. Centrifuger la culture pendant 10 min à 1250 TPM.
4. Enlever le milieu à l'aide d'une pipette de 10 ml.
5. Préparer le flacon de culture avec RPMI, SH, L-Glut. Selon les quantités présentées dans la tableau. Tous les composants du milieu de culture devront être à 37 ºC

Volumes culture *P. falciparum*

PETITE BOÎTE 25 cm^2		GROSSE BOÎTE 75 cm^2	
RPMI:	8,5 ml (csp)	27 ml (csp)	RPMI
SH:	0,7 ml (6,5%)	2 ml (6,5%)	SH
L-glut.	0,1 ml (1%)	0,3 ml (1%)	L-glut.
GR: (total)	0,4 ml (4%)	1,2 ml (4%)	GR: (total)
Vol. Totale	9,7 ml	30,5 ml	Vol. Totale

Dilutions des GR

% Parasitémie	
0 - 1	Pas de changement de milieu
.2 – 3	Changer milieu
> 3	Faire dilution

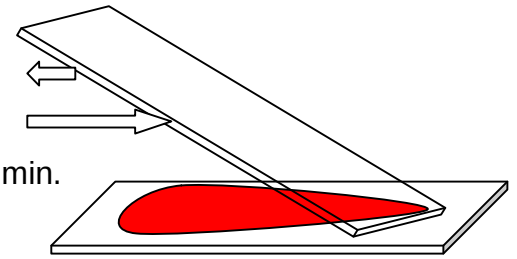
Week-end ramener parasitémie à 0,5-0,7 % au lieu de 2 % (un jour sans changer de milieu)

V2 * 2%
% parasitémie

6. Calculer la dilution de GRP selon la parasitémie trouvée
7. Ajouter au flacon de culture les GRS et les GRP de sorte que la parasitémie soit portée à 2 % (sauf le week-end quand la parasitémie est ramenée à 0,5-0,7 % pour laisser une jour sans changer le milieu), agiter doucement.
8. La culture est alors laissée dans l'incubateur à CO_2 à 37 ºC.

Evaluation de la parasitémie (frottis et coloration de Giemsa)

1. Prendre 100 µl de la culture et placer dans un tube eppendorf®.
2. Centrifuger pendant 1 min à l'aide d'une mini centrifugeuse.
3. Prendre 5 µl du culot pour faire un frottis.
4. Fixe la lame au méthanol pendant 1 min.
5. Colorer au Giemsa fraîchement préparé, pendant 20 min.
6. Laver à l'eau et laisser sécher.
7. La parasitémie est évaluée à l'aide d'un microscope.



$$\% \text{ Parasitémie} = \left(\frac{\text{Globules Rouges Parasitées}}{\text{Globules Rouges Parasitées + Globules Rouges Sains}} \right) \times 100$$

Décongélation de la souche

1. Le cryotube contenant la souche est retiré du congélateur et placé à 37 ºC jusqu'à décongélation totale.
2. Ajouter doucement (avec agitation lisse et constante) 100 µl de solution stérile de NaCl 12 %. À la fin transvaser le mélange dans un tube à centrifuger de 14 ml. Attendre 5 min.
3. Ajouter doucement (1 goutte par seconde avec agitation constante) 5 ml de solution stérile de NaCl 1,6 %.
4. Centrifuger pendant 10 min à 1250 TPM.
5. Rejeter le surnageant et ajouter doucement (1 goutte par seconde avec agitation constante) 5 ml de solution stérile de NaCl 0,9 % avec glucose 0,2 %.
6. Centrifuger pendant 10 min à 1250 TPM.
7. Rejeter le surnageant et laver avec 5 ml de milieu RPMI.
8. Centrifuger pendant 10 min à 1250 TPM.
9. Mettre la culture dans des flacons de 25 cm^2, contenant 8,5 ml de milieu RPMI 1640, 0,7 ml de SH, 0,1 ml de L-glut. et 400 µl de sang parasité.
10. Changer le milieu quotidiennement.
11. Après 3 jours faire un frottis, évaluer la parasitémie et faire les ajustements de parasitémie autour de 2 % avec des hématies saines.

Congélation de la souche

Sur une culture avec prédominance de parasites au stade anneau et une parasitémie supérieure à 4 %.

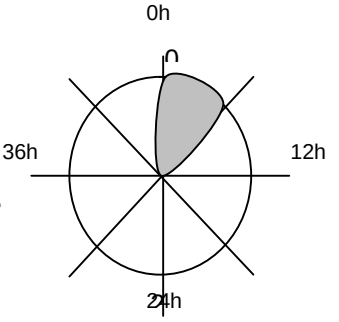
1. Rincer deux fois avec du RPMI pour enlever toute trace de sérum.
2. Ajouter (1 goutte par seconde avec agitation constante) la solution stérile de congélation (Glycérol 6,2M, Lactate de sodium 0,14M KCl 0,005M) préalablement préchauffée à 37 ºC, quatre fois le volume du culot globulaire.
3. Aliquoter dans des cryotubes stériles par volumes de 500 µl.
4. Les cryotubes sont identifiés et datés.
5. Placer directement les cryotubes dans l'azote liquide.
6. Mettre à jour l'inventaire de stockage de souches.

A3. Protocoles de synchronisation de la souche de *P. falciparum*

Concentration de formes jeunes parasitaires (Sorbitol)

Travailler sur une culture asynchrone de *P. falciparum* FcB1 ayant une parasitémie d'environ 5 % contenant essentiellement des formes jeunes,

1. Une solution de D-sorbitol 5 % (5g dans 100 ml de PBS pH 7,4, filtrer sur 0,22 µm, conservée à 4°C) est préchauffée à 37°C.
2. Centrifuger la culture 5 min, 1250 TPM.
3. Eliminer le surnageant.
4. Ajouter à 1 volume de culot 9 volumes de sorbitol à 5 %.
5. Placer au bain-marie à 37°C pendant 10 minutes.
6. Centrifuger 5 min, 1250 TPM.
7. Le culot est rincé 3 fois avec du RPMI
8. Remettre en culture les parasites du culot (ajouter des GRS pour assurer le développement des mérozoïtes libérés)

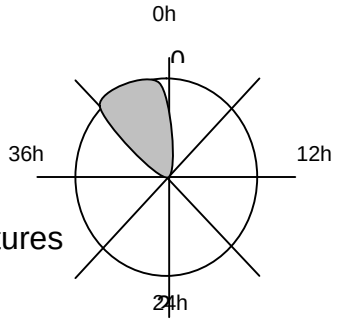


Répéter la procédure après 24 h, Il faut avoir au moins 0,5% de GRP pour faire l'essai du stade sensible.

Synchronisation avec plasmion®

Sur une culture asynchrone de *P. falciparum* FcB1 ayant une parasitémie d'environ 6 % contenant essentiellement des formes âgées,

1. Centrifuger 10 min, 1250 TPM (232 g)
2. Eliminer le surnageant
3. Ajouter à 1 volume de culot 3 volumes de RPMI
4. Au volume final (3+1) ajouter 1 volume égal de Plasmion® (préchauffée à 37°C, ajouter doucement)
5. Agiter doucement
6. Placer dans l'incubateur à CO_2 et 37 °C pendant 20 min, le tube devra être positionné parfaitement vertical
7. Récupérer la phase supérieure qui contient les parasites matures
8. Centrifuger la phase supérieure 10 min, 1250 TPM
9. Effectuer un frottis pour quantifier la parasitémie



Remettre en culture les parasites synchronisés avec des GRS à un hématocrite de 5% et une parasitémie de 1% pour permettre la réinvasion.

A4. Protocoles de l'essai de stade sensible *in vitro*

A4. Protocoles de l'essai de stade sensible *in vitro*

Procédure opérationnelle

TEMPS: 0 h — Jour: _____ Heure: _____

1. Placer 200 µL de GRsains dans les puits correspondants (Blanc)
2. Déposer 100 µL de GRP dans les puits correspondants
3. Placer les concentrations de solution d'essai 100 µL dans les puits indiqués
4. Ajouter 100 µL de RPMI aux Plaques restantes P1B, P2A, P2B, P3A et P3B
5. Placer les plaques en incubateur CO2 37°C

TEMPS: 8 h — Jour: _____ Heure: _____

AGIR SEULEMENT SUR LA PLAQUE P1A

1. Centrifuger la plaque 5 min, 1250 TPM
2. Retirer le surnageant 150 µL
3. Ajouter RPMI volume égal
4. Agiter lissement
5. Centrifuger la plaque 5 min, 1250 TPM
6. Retirer le surnageant 150 µL

(Trois Fois)

7. Ajouter SOLUTION DE REMPLISSAGE, volume égal au retraité.
8. Agiter doucement
9. Placer le plaque en incubateur CO2 37°C

AGIR SEULEMENT SUR LA PLAQUE P1B

1. Centrifuger la plaque 5 min, 1250 TPM
2. Retirer le surnageant 100 µL
3. Placer les concentrations de solution d'essai 100 µL dans les puits indiqués
4. Agiter doucement
5. Placer la plaque en incubateur CO2 37°C

TEMPS: 16 h — Jour: _____ Heure: _____

AGIR SEULEMENT SUR LA PLAQUE P1B

1. Centrifuger la plaque 5 min, 1250 TPM
2. Retirer le surnageant 150 µL
3. Ajouter RPMI volume égal
4. Agiter lissement
5. Centrifuger la plaque 5 min, 1250 TPM
6. Retirer le surnageant 150 µL

(Deux Fois)

7. Ajouter SOLUTION DE REMPLISSAGE, volume égal au retraité.
8. Agiter doucement
9. Placer le plaque en incubateur CO2 37°C

AGIR SEULEMENT SUR LA PLAQUE P2A

1. Centrifuger la plaque 5 min, 1250 TPM
2. Retirer le surnageant 100 µL
3. Placer les concentrations de solution d'essai 100 µL dans les puits indiqués
4. Agiter doucement
5. Placer la plaque en incubateur CO2 37°C

TEMPS: 24 h — Jour: _____ Heure: _____

AGIR SEULEMENT SUR LA PLAQUE P2A

1. Centrifuger la plaque 5 min, 1250 TPM
2. Retirer le surnageant 150 µL
3. Ajouter RPMI volume égal
4. Agiter lissement
5. Centrifuger la plaque 5 min, 1250 TPM
6. Retirer le surnageant 150 µL

(Trois Fois)

7. Ajouter SOLUTION DE REMPLISSAGE, volume égal au retraité.
8. Agiter doucement
9. Placer le plaque en incubateur CO2 37°C

AGIR SEULEMENT SUR LA PLAQUE P2B

1. Centrifuger la plaque 5 min, 1250 TPM
2. Retirer le surnageant 100 µL
3. Placer les concentrations de solution d'essai 100 µL dans les puits indiqués
4. Agiter doucement
5. Placer la plaque en incubateur CO2 37°C

TEMPS: 32 h — Jour: _____ Heure: _____

AGIR SEULEMENT SUR LA PLAQUE P2B

1. Centrifuger la plaque 5 min, 1250 TPM
2. Retirer le surnageant 150 µL
3. Ajouter RPMI volume égal
4. Agiter lissement
5. Centrifuger la plaque 5 min, 1250 TPM
6. Retirer le surnageant 150 µL

(Trois Fois)

7. Ajouter SOLUTION DE REMPLISSAGE, volume égal au retraité.
8. Agiter doucement
9. Placer le plaque en incubateur CO2 37°C

AGIR SEULEMENT SUR LA PLAQUE P3A

1. Centrifuger la plaque 5 min, 1250 TPM
2. Retirer le surnageant 100 µL
3. Placer les concentrations de solution d'essai 100 µL dans les puits indiqués
4. Agiter doucement
5. Placer la plaque en incubateur CO2 37°C

TEMPS: 40 h — Jour: _____ Heure: _____

AGIR SEULEMENT SUR LA PLAQUE P3A

1. Centrifuger la plaque 5 min, 1250 TPM
2. Retirer le surnageant 150 µL
3. Ajouter RPMI volume égal
4. Agiter lissement
5. Centrifuger la plaque 5 min, 1250 TPM
6. Retirer le surnageant 150 µL

(Trois Fois)

7. Ajouter SOLUTION DE REMPLISSAGE, volume égal au retraité.
8. Agiter doucement
9. Placer le plaque en incubateur CO2 37°C

AGIR SEULEMENT SUR LA PLAQUE P3B

1. Centrifuger la plaque 5 min, 1250 TPM
2. Retirer le surnageant 100 µL
3. Placer les concentrations de solution d'essai 100 µL dans les puits indiqués
4. Agiter doucement
5. Placer la plaque en incubateur CO2 37°C

TEMPS: 48 h — Jour: _____ Heure: _____

AGIR SEULEMENT SUR LA PLAQUE P3B

1. Centrifuger la plaque 5 min, 1250 TPM
2. Retirer le surnageant 150 µL
3. Ajouter RPMI volume égal
4. Agiter lissement
5. Centrifuger la plaque 5 min, 1250 TPM
6. Retirer le surnageant 150 µL

(Trois Fois)

7. Ajouter SOLUTION DE REMPLISSAGE, volume égal au retraité.
8. Agiter doucement
9. Placer le plaque en incubateur CO2 37°C

AGIR SUR TOUTES LES PLAQUES

1. MARCAGE AVEC SOLUTION DE HYPOXANTHINE: Ajouter 25 µL/puit

TEMPS: 84 h — Jour: _____ Heure: _____

AGIR SUR TOUTES LES PLAQUES

1. Congélation

Calculs nécessaires

Ces calculs ont été programmés sur l'Excel® pour être automatiquement effectués en seulement fournir le nombre de plaques à préparer et la parasitemie de la culture

SOLUTIONS DES GLOBULES ROUGES		GRP (% finale)	GR Sains (% finale)
(il plie de la concentration finale)	RPMI:	19,80 mL (csp)	2,310 mL (csp)
	SERUM:	5,28 mL (10%)	0,264 mL (10%)
Plaques à préparer: 3	L-glutamine	0,528 mL (1%)	0,026 mL (1%)
Début Incubation	GR:	0,792 mL GRP (1,5%)	0,040 mL GRS (1,5%)
	Vol. Tot./2	26,4 mL	2,6 mL
	Tube à employ	50 mL	15 mL

Parasitemie = _____ %

V1 = 0,792 * **0,5%** / Parasitemie

V1*C1 = V2*C2
GRP
GRS

MARCAGE AVEC LA SOLUTION DE HYPOXANTHINE :

Ajouter 36h00 avant congélation 25 µL/puit

Hypoxanthine*	66,00 µL
RPMI:	5,214 mL
Volume Totale	5,280 mL

ADDITION DES SOLUTIONS D'ESSAI AU DOUBLE DE LA CONCENTRATION FINALE

Volume à ajouter = 100 µl du drug

SOLUTION DE REMPLISSAGE — RPMI: 23,76 mL (csp) — SERUM: 6,34 mL (10%) — L-glutamine 0,634 mL (1%)

RPMI Lavage = 39,6

Exemple d'ordre de travail essai de stade sensible *in vitro*

Date: **Plaques:** 1-3 **Souche:** FcB1

CQ	**CI (50) =**	**0,044**	**µg/mL**
	25600% CI (50)	11,357 µg/mL	
	Sol. mère	5 mg dans 20 mL EAU	
	250	5 mL dans RPMI csp 10mL	
	125,0	0,909 mL dans RPMI csp 10mL	
	11,357 **µg/mL**		

Ces calculs ont été programmés sur l'Excel® pour être automatiquement effectués en seulement fournir la CI(50) et la concentration de la solution mère

DILUTIONS INTERMÉDIAIRES µg/mL

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	12800% CI (50)	5,6787	125 µL RPMI + 125 µL Sln		CQ	CQ	CQ	CQ	CQ	CQ	CQ	CQ	CQ
B	6400% CI (50)	2,8393	125 µL RPMI + 125 µL A1		CQ	CQ	CQ	CQ	CQ	CQ	CQ	CQ	CQ
C	3200% CI (50)	1,4197	125 µL RPMI + 125 µL A2		CQ	CQ	CQ	CQ	CQ	CQ	CQ	CQ	CQ
D	1600% CI (50)	0,7098	125 µL RPMI + 125 µL A3		CQ	CQ	CQ	CQ	CQ	CQ	Rendre deux plaques complètes		CQ
E	800% CI (50)	0,3549	125 µL RPMI + 125 µL A4		CQ	CQ	CQ	CQ	CQ	CQ			CQ
F	400% CI (50)	0,1775	125 µL RPMI + 125 µL A5		CQ	CQ	CQ	CQ	CQ	CQ			CQ
G	200% CI (50)	0,0887	125 µL RPMI + 125 µL A6		CQ	CQ	CQ	CQ	CQ	CQ	CQ	CQ	CQ
H	100% CI (50)	0,0444	125 µL RPMI + 125 µL A7		CQ	CQ	CQ	CQ	CQ	CQ	CQ	CQ	CQ

CONCENTRATIONS FINALES EN PLAQUE EN AJOUTANT LE SANG

P 1A t = 0-8h **P 1B** t = 8-16h

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	6400% CI (50)	2,8393	2,8393	2,8393	2,8393	Témoin A	Témoin B	2,8393	2,8393	2,8393	2,8393	6400% CI (50)
B	3200% CI (50)	1,4197	1,4197	1,4197	1,4197	Témoin A	Témoin B	1,4197	1,4197	1,4197	1,4197	3200% CI (50)
C	1600% CI (50)	0,7098	0,7098	0,7098	0,7098	Témoin A	Témoin B	0,7098	0,7098	0,7098	0,7098	1600% CI (50)
D	800% CI (50)	0,3549	0,3549	0,3549	0,3549	Témoin A	Témoin B	0,3549	0,3549	0,3549	0,3549	800% CI (50)
E	400% CI (50)	0,1775	0,1775	0,1775	0,1775			0,1775	0,1775	0,1775	0,1775	400% CI (50)
F	200% CI (50)	0,0887	0,0887	0,0887	0,0887	Blanc	Blanc	0,0887	0,0887	0,0887	0,0887	200% CI (50)
G	100% CI (50)	0,0444	0,0444	0,0444	0,0444	Blanc	Blanc	0,0444	0,0444	0,0444	0,0444	100% CI (50)
H	50% CI (50)	0,0222	0,0222	0,0222	0,0222			0,0222	0,0222	0,0222	0,0222	50% CI (50)

Plaque 100 µl Sln. d'essai + 100 µl GRP **Témoin** 100 µL RPMI + 100 µl GRP **Blanc** 100 µL RPMI + 100 µl GR SAINS

Frottis 60h Frottis 60h

CONCENTRATIONS FINALES EN PLAQUE EN AJOUTANT LE SANG

P 2A t = 16-24h **P 2B** t = 24-32h

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	6400% CI (50)	2,8393	2,8393	2,8393	2,8393	Témoin A	Témoin B	2,8393	2,8393	2,8393	2,8393	6400% CI (50)
B	3200% CI (50)	1,4197	1,4197	1,4197	1,4197	Témoin A	Témoin B	1,4197	1,4197	1,4197	1,4197	3200% CI (50)
C	1600% CI (50)	0,7098	0,7098	0,7098	0,7098	Témoin A	Témoin B	0,7098	0,7098	0,7098	0,7098	1600% CI (50)
D	800% CI (50)	0,3549	0,3549	0,3549	0,3549	Témoin A	Témoin B	0,3549	0,3549	0,3549	0,3549	800% CI (50)
E	400% CI (50)	0,1775	0,1775	0,1775	0,1775			0,1775	0,1775	0,1775	0,1775	400% CI (50)
F	200% CI (50)	0,0887	0,0887	0,0887	0,0887	Blanc	Blanc	0,0887	0,0887	0,0887	0,0887	200% CI (50)
G	100% CI (50)	0,0444	0,0444	0,0444	0,0444	Blanc	Blanc	0,0444	0,0444	0,0444	0,0444	100% CI (50)
H	50% CI (50)	0,0222	0,0222	0,0222	0,0222			0,0222	0,0222	0,0222	0,0222	50% CI (50)

Plaque 100 µl Sln. d'essai + 100 µl GRP **Témoin** 100 µL RPMI + 100 µl GRP **Blanc** 100 µL RPMI + 100 µl GR SAINS

Frottis 60h Frottis 60h

CONCENTRATIONS FINALES EN PLAQUE EN AJOUTANT LE SANG

P 3A t = 32-40h **P 3B** t = 40-48h

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	6400% CI (50)	2,8393	2,8393	2,8393	2,8393	Témoin A	Témoin B	2,8393	2,8393	2,8393	2,8393	6400% CI (50)
B	3200% CI (50)	1,4197	1,4197	1,4197	1,4197	Témoin A	Témoin B	1,4197	1,4197	1,4197	1,4197	3200% CI (50)
C	1600% CI (50)	0,7098	0,7098	0,7098	0,7098	Témoin A	Témoin B	0,7098	0,7098	0,7098	0,7098	1600% CI (50)
D	800% CI (50)	0,3549	0,3549	0,3549	0,3549	Témoin A	Témoin B	0,3549	0,3549	0,3549	0,3549	800% CI (50)
E	400% CI (50)	0,1775	0,1775	0,1775	0,1775			0,1775	0,1775	0,1775	0,1775	400% CI (50)
F	200% CI (50)	0,0887	0,0887	0,0887	0,0887	Blanc	Blanc	0,0887	0,0887	0,0887	0,0887	200% CI (50)
G	100% CI (50)	0,0444	0,0444	0,0444	0,0444	Blanc	Blanc	0,0444	0,0444	0,0444	0,0444	100% CI (50)
H	50% CI (50)	0,0222	0,0222	0,0222	0,0222			0,0222	0,0222	0,0222	0,0222	50% CI (50)

Plaque 100 µl Sln. d'essai + 100 µl GRP **Témoin** 100 µL RPMI + 100 µl GRP **Blanc** 100 µL RPMI + 100 µl GR SAINS

Frottis 60h Frottis 60h

A5. Protocoles de l'essai de stade sensible *in vitro*

Exemple d'ordre de travail essai de stade sensible *in vitro*

Date: Plaque: Souche: FcM29

MB		DILUTIONS PRÉALABLES		
	Sol. mere	10000	0,01 mL en 10mL RPMI	
		10,0	0,1 mL en 10 mL RPMI	
		0,10	µg/mL	
CI (50)	0,0020 µg/mL	Stn. Conc.	Dilutions	
0% CI (50)	0			
25% CI (50)	0,00050 µg/mL	0,002	0,030	mL en RPMI csp 1,5 mL
50% CI (50)	0,00100 µg/mL	0,004	0,060	mL en RPMI csp 1,5 mL
75% CI (50)	0,00150 µg/mL	0,006	0,090	mL en RPMI csp 1,5 mL
100% CI (50)	0,00200 µg/mL	0,008	0,120	mL en RPMI csp 1,5 mL
200% CI (50)	0,00400 µg/mL	0,016	0,240	mL en RPMI csp 1,5 mL

ARTEMETHER		DILUTIONS PRÉALABLES		
37,25 mg en 10 mL MeOH		3725	50 µL en 10 mL MeOH	
		18,6	10 µL en 5 mL RPMI	
		0,04	µg/mL	
CI (50)	0,0047 µg/mL	Stn. Conc.	Dilutions	
0% CI (50)	0			
25% CI (50)	0,00118 µg/mL	0,0047	0,189	mL en RPMI csp 1,5 mL
50% CI (50)	0,00235 µg/mL	0,0094	0,379	mL en RPMI csp 1,5 mL
75% CI (50)	0,00353 µg/mL	0,0141	0,568	mL en RPMI csp 1,5 mL
100% CI (50)	0,00470 µg/mL	0,0188	0,757	mL en RPMI csp 1,5 mL
200% CI (50)	0,00940 µg/mL	0,0376	1,514	mL en RPMI csp 1,5 mL

CONCENTRATIONS FINALES EN PLAQUE EN AJOUTANT LE SANG

ARTEMET CI50		0% 1	0% 2	25% 3	25% 4	50% 5	50% 6	75% 7	75% 8	100% 9	100% 10	200% 11	200% 12
MB % CI50	A				Témoin	Témoin	Témoin	Blanc	Blanc	Blanc			
0%	B	0	0	0,00118	0,00118	0,00235	0,00235	0,00353	0,00353	0,00470	0,00470	0,00940	0,00940
25%	C	0,0005	0,00050										
50%	D	0,001	0,00100										
75%	E	0,0015	0,00150										
100%	F	0,002	0,00200										
200%	G	0,004	0,00400										
	H				Témoin	Témoin	Témoin	Blanc	Blanc	Blanc			

Plaque	100 µl Stn. d'essai + 100 µl GRP	Témoin	100 µL RPMI + 100 µl GRP	Blanc	100 µL RPMI + 100 µl GR SAINS

Calculs nécessaires

Ces calculs ont été programmés sur l'Excel® pour être automatiquement effectués en seulement fournir le nombre de plaques à préparer et la parasitemie de la culture

SOLUTIONS DES GLOBULES ROUGES		GRP (% finale)	GR Sains (% finale)
(il plie de la concentration finale)	RPMI:	7,56 mL (csp)	1,260 mL (csp)
	SERUM:	2,02 mL (10%)	0,144 mL (10%)
Plaques à préparer: 1	L-glutami	0,202 mL (1%)	0,014 mL (1%)
Début Incubation	GR:	0,302 mL GRP (1,5%)	0,022 mL GRS (1,5%)
Addition Hypoxanthine*	Vol. Tot/2	10,08 mL	1,440 mL
Fin Incubation:	Tube à emp	50 mL	15 mL

ADDITION DES SOLUTIONS D'ESSAI AU DOUBLE DE LA CONCENTRATION FINALE

Volume à ajouter = 50 µl du quelque drug

Parasitemie = %

V1 = 0,302 * 2% (Parasitemie)

V1*C1 = V2*C2

GRP	
GRS	

MARCAGE AVEC LA SOLUTION DE HIPOXANTINA :

Ajouter 24h00 avant congélation 25 µL/puit

Hipoxantina*	25,20 µL
RPMI:	1,9908 mL
Volume Totale	2,016 mL

A6 Spectrométrie de masses conditions d'appareil

Service Commun de Spectrométrie de Masse API 365 Acq. Date: n/a
FR2599 Acq. Time: n/a
Université Paul Sabatier, 118 route de Narbonne

File Information for Sample 18 (MB, pos) of 05 janvier.wiff

File Name:	05 janvier.wiff
File Path:	D:\Analyst Data\Projects\janvier 2006 API\Data\
Original Name:	05 janvier.wiff

Log Information from Devices at Start of acquisition:

Mass Spectrometer	API 365	0
Config Table Ver	01	
Firmware Ver	M401400 B4T0301 M3L1400 B3T0300	
Component Name	Triple Quadrupole LC/MS/MS Mass Spectrometer	
Component ID	API 365	
Manufacturer	Perkin-Elmer Sciex Instruments	
Model	017280-B1	
S/N	0459706	

Time from start =0.0167 min

Mass Spectrometer	API 365	0
Start of Run - Detailed Status		
Vacuum Status		At Pressure
Vacuum Gauge (10e-5 Torr)		0.7
Backing Pump		Ok
Interface Pump		Ok
Curtain Gas		Ok
Interface Turbo Pump		Normal
Analyzer Turbo Pump		Normal
Sample Introduction Status		Ready
Source/Ion Path Electronics		On
Source Type		Ion Spray
Source Temperature		Not Applicable
Source Exhaust Pump		Ok
Injection Manifold		Bypass

Parameters changed in manual tune.Time from start =0.3667 min

OR = 30.0

Parameters changed in manual tune.Time from start =0.5167 min

OR = 10.0

Parameters changed in manual tune.Time from start =0.9167 min

OR = 50.0

Stopping acquisition.

Mass Spectrometer	API 365	0
End of Run - Detailed Status		

Sample Name: n/a Scan Mass(es): n/a

Polarity/Scan Type: n/a Collision Energy: n/a

Vacuum Status	At Pressure
Vacuum Gauge (10e-5 Torr)	0.7
Backing Pump	Ok
Interface Pump	Ok
Curtain Gas	Ok
Interface Turbo Pump	Normal
Analyzer Turbo Pump	Normal
Sample Introduction Status	Ready
Source/Ion Path Electronics	On
Source Type	Ion Spray
Source Temperature	Not Applicable
Source Exhaust Pump	Ok
Injection Manifold	Bypass

Acquisition Info

Acquisition Method:	\testTune.dam
Acquisition Path:	D:\Analyst Data\Projects\janvier 2006 API\Acquisition Methods\
Created:	Thursday January 05, 2006 08: 52: 05 AM
Modified:	Thursday January 05, 2006 03: 36: 36 PM
Acquisition Time:	Thursday, January 05, 2006, 03:36:37 PM
Acquisition Duration	4min59sec
Number of Scans:	199
Periods in File:	1
Batch Name:	\ManualTune.bat
Batch Path:	D:\Analyst Data\Projects\janvier 2006 API\Batch\
Submitted by:	PC-159A\SCSM API 365(SCSM API 365)
Logged-on User:	PC-159A\SCSM API 365
Synchronization Mode:	No Sync
Auto-Equilibration:	Off
Comment:	
Software Version:	Analyst 1.3.1
Set Name:	Set 1
Sample Name:	MB, pos
Sample ID:	TuneSampleID
Sample Comments:	

Quantitation Information:

Sample Type:	Unknown
Dilution Factor:	0.000000

Custom Data:

Quantitation Table:

Period 1:

Scans in Period:	199
Relative Start Time:	0.00 msec

Experiments in Period: 1

Period 1 Experiment 1:

Scan Type: Q1 MS (Q1)
Polarity: Positive
Scan Mode: Profile
Ion Source: Ion Spray
Resolution Q1: UNIT
Intensity Thres.: 0.00 cps
Settling Time: 0.0000 msec
MR Pause: 5.0070 msec
MCA: No
Center/Width: No
Step Size: 0.10 amu

Start (amu)	Stop (amu)	Time (sec)	Param	Start	Stop
270.00	1000.00	1.50	CEP	16.33	36.87

Parameter Table(Period 1 Experiment 1)

NEB:	8.00	
CUR:	12.00	
IS:	4700.00	Ion spray voltage (V)
DP	50.00	Declustering potential (V)
FP	280.00	Focusing potential (V)
EP	10.00	

Resolution tables

Quad 1 Positive Unit Resolution
Last Modification Date Time: November 16, 2005 09:06:48

IE1 1.000

Mass (amu)	Offset Value
59.050	0.020
175.133	-0.005
616.464	-0.115
906.673	-0.183
1254.925	-0.283
1545.134	-0.352
2010.469	-0.468
2242.637	-0.525

Calibration tables

Quad 1 Positive Unit Resolution
Last Modification Date Time: November 16, 2005 09:06:48

Mass (amu)	Dac Value
59.050	1115
175.133	3357

616.464	11880
906.673	17484
1254.925	24206
1545.134	29805
2010.469	38783
2242.637	43258

Quad 3 Positive Unit Resolution
Last Modification Date Time: April 25, 2005 10:24:57

Mass (amu)	Dac Value
59.050	1104
175.133	3330
616.464	11794
906.673	17358
1254.925	24036
1545.134	29600
2010.469	38520
2242.637	42969

Instrument Parameters:
Detector Parameters (Positive):

DF	-200.0
CEM	1900.0

Keyed Text:
File was created with the software version: Analyst 1.3.1

Experimental pharmacological study of the antimalarial activity of a compound of synthesis: the methylthioninium chloride

SUMMARY

We studied the antimalarial activity of methylene blue (BM), which was the first synthetic molecule used in the treatment of malaria. We showed that BM is active on *Plasmodium falciparum* strains from different geographical origins and chloroquino-sensitivities (IC_{50}<10nM). It is also active on the blood cycle of rodent malaria (ED_{50}<15mg/Kg), but not on the hepatic phase. The most sensitive erythrocytic stages are young stages. Associations with traditional treatments are: antagonist with amodiaquine; antagonism-additive with atovaquone, doxycycline, pyrimethamine; additive-pas d'interaction with artemether, chloroquine, mefloquine, primaquine and synergistic with quinine. We showed by spectrometry UV, TLC and mass spectrometry, that there is no association between BM and hem. We also developed a new technique to measure the transformation of hem by the glutathione and to measure the activity of drugs on this transformation.

KEY WORDS : Malaria ; Antimalarials ; Pharmacology ; *Plasmodium* ; Methylene blue ; Chemosensibility ; Drug interactions ; Sensible stage ; Glutathione ; Haem.

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE – Pharmacological Innovation.

UMR 152 IRD-UPS
Institut de Recherche pour le Développement - Université Paul Sabatier
Faculté des Sciences Pharmaceutiques,
118, Route de Narbonne, 31062 Toulouse cedex 9
France

Nom et prénom : GARAVITO Giovanny
Début du titre : 2007
Année de soutenance : 2007