



HAL
open science

Plantes médicinales guinéennes : validation de l'effet antipaludique et impact sur la modulation de l'immunité

Aïssata Camara

► To cite this version:

Aïssata Camara. Plantes médicinales guinéennes : validation de l'effet antipaludique et impact sur la modulation de l'immunité. Immunologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III; Université Gamal Abdel Nasser (Conakry), 2020. Français. NNT : 2020TOU30028 . tel-03008482

HAL Id: tel-03008482

<https://theses.hal.science/tel-03008482v1>

Submitted on 16 Nov 2020

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.

THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Cotutelle internationale : Université Gamal Abdel Nasser de Conakry

Présentée et soutenue par

Aissata CAMARA

Le 24 juin 2020

**Plantes médicinales guinéennes : validation de l'effet
antipaludique et impact sur la modulation de l'immunité**

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **PHARMACOLOGIE**

Unité de recherche :

**PHARMA-DEV -Laboratoire Pharmacochimie et Pharmacologie pour le
Développement**

Thèse dirigée par

Agnès AUBOUY et Mamadou Aliou BALDE

Jury

M. Vincent ROUMY, Rapporteur

M. David COURTIN, Rapporteur

M. Alexis VALENTIN, Examinateur

Mme Sandrine HOUZÉ, Examinatrice

Mme Agnès AUBOUY, Directrice de thèse

M. Mamadou Aliou BALDE, Co-directeur de thèse

Résumé

Le paludisme demeure la première préoccupation médicale de bien des pays africains dont la Guinée où la quasi-totalité de la population est exposée au risque d'infection avec une prévalence estimée à 15% chez les enfants de moins de 5 ans. En dehors de la médecine conventionnelle, la pharmacopée et la médecine traditionnelle guinéennes constituent des recours fréquents dans la gestion du paludisme par les familles. A cet égard, des enquêtes ethnobotaniques ont permis de recenser et de collecter de nombreuses plantes médicinales parmi lesquelles *Terminalia albida*, *Desmodium velutinum* et *Rourea minor*.

Dans le cadre d'une validation des usages traditionnels, ces plantes ont été évaluées *in vitro* avec la souche chloroquino-résistante PjK1 et *in vivo* dans deux modèles murins à *Plasmodium chabaudi chabaudi* pour le paludisme simple, et à *Plasmodium berghei ANKA* pour le neuropaludisme. Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence le potentiel antipaludique de *T.albida*. En outre, la comparaison de deux extraits de *T. albida* issus de deux régions différentes de Guinée, a permis de mettre en évidence des efficacités *in vitro* et *in vivo* différentes selon la provenance de la plante.

Afin de comprendre les mécanismes d'action de *T. albida* dans le modèle de neuropaludisme, les capacités anti-inflammatoires et anti-oxydantes de la plante ont été étudiées *in vivo* et *in vitro* dans des conditions inflammatoires. *In vivo*, l'administration de l'extrait de *T.albida* a permis de limiter le recrutement des lymphocytes T et l'expression des marqueurs pro-inflammatoires dans le cerveau des souris traitées. Ces propriétés ont été confirmées *in vitro* dans un modèle inflammatoire non palustre. *In vitro*, *T.albida* a également démontré une remarquable activité dose-dépendante de neutralisation des espèces réactives de l'oxygène. Ainsi, les propriétés anti-inflammatoires et anti-oxydantes de *T.albida* participent à la résolution du neuropaludisme dans le modèle d'infection à *P. berghei ANKA*.

Des investigations phytochimiques ont permis d'identifier trente-huit composés dans l'écorce de la tige de *T. albida*. Parmi elles, plusieurs molécules déjà identifiées peuvent être responsables des différentes activités biologiques observées, notamment les tanins et les triterpénoïdes.

Enfin, des investigations botaniques ont permis de fournir des éléments caractéristiques permettant de déterminer la provenance de *T. albida* et de mettre en évidence l'influence de l'écosystème sur la production des métabolites secondaires dans les espèces de *Terminalia* récoltées à différents endroits.

Ces résultats confirment l'effet antipaludique de *T. albida* et valident son usage traditionnel. Cependant, des études complémentaires sont nécessaires pour identifier plus précisément les molécules actives. Les activités anti-inflammatoires et anti-oxydantes de *T. albida* démontrées dans ce travail présentent également un intérêt pour la prise en charge de nombreuses pathologies, autres que le paludisme.

Mots clés : Guinée, plantes médicinales, médecine traditionnelle, *Terminalia albida*, *Desmodium velutinum*, *Rourea minor*, paludisme, paludisme cérébral, réponse inflammatoire, stress oxydatif, UHPLC-HRMS, *Plasmodium berghei*, *Plasmodium chabaudi*, localisation géographique

Abstract

Malaria remains the primary medical concern in many African countries, including Guinea, where almost the entire population is at risk of infection with an estimated prevalence of 15% among children under 5 years of age. Apart from conventional medicine, Guinean pharmacopoeia and traditional medicine are frequent uses in the management of malaria by families. In this respect, previous ethnobotanical surveys have identified and collected many medicinal plants in Guinea, including *Terminalia albida*, *Desmodium velutinum* and *Rourea minor*.

As part of a validation of traditional uses, these plants were evaluated *in vitro* with the chloroquine resistant strain PfK1 and *in vivo* in two murine models: *Plasmodium chabaudi chabaudi* for uncomplicated malaria, and *Plasmodium berghei ANKA* for cerebral malaria. The results obtained highlighted the antimalarial effect of *T. albida*. In addition, the comparison of two extracts of *T. albida* from two different regions of Guinea revealed different *in vitro* and *in vivo* efficacy depending on the origin of the plant.

In order to understand the mechanisms of action of *T. albida* in the cerebral malaria model, the plant's anti-inflammatory and antioxidant capacities were studied *in vivo* and *in vitro* under inflammatory conditions. *In vivo*, the administration of *T. albida* extract limited T cell recruitment and expression of pro-inflammatory markers in the brains of treated mice. These properties were confirmed *in vitro* in a non-malarial inflammatory model. *In vitro*, *T. albida* also demonstrated a remarkable dose-dependent activity by neutralizing reactive oxygen species. Thus, the anti-inflammatory and antioxidant properties of *T. albida* contribute to the resolution of cerebral malaria in the *P. berghei ANKA* infection model.

Phytochemical investigations have identified thirty-eight compounds in the bark of the stem of *T. albida*. Among them, several molecules already identified may be responsible for the different biological activities observed, including tannins and triterpenoids.

Finally, botanical investigations provided characteristic elements to determine the origin of *T. albida* and to highlight the influence of the ecosystem on the production of secondary metabolites in *Terminalia* species collected at different locations.

These results confirm the antimalarial effect of *T. albida* and validate its traditional use. However, further studies are needed to identify more precisely the active molecules. The anti-inflammatory and antioxidant activities of *T. albida* demonstrated in this work are also of interest for the management of many diseases, other than malaria.

Keywords: Guinea, medicinal plants, traditional medicine, *Terminalia albida*, *Desmodium velutinum*, *Rourea minor*, malaria, cerebral malaria, inflammatory response, oxidative stress, UHPLC-HRMS, *Plasmodium berghei*, *Plasmodium chabaudi*, geographical location

DEDICACE

À ma famille

Remerciements

Cette thèse a été réalisée avec le concours financier de l'Ambassade de France en Guinée à travers son programme de bourse du Service de Coopération et d'Action Culturelle, du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique, de l'Université Gamal Abdel Nasser, de l'Institut de Recherche et de Développement des Plantes Médicinales et Alimentaires de Guinée (IRDPMAG) et de PHARMADEV (UMR152 IRD/UPS) Toulouse. Qu'il me soit permis d'exprimer mes remerciements à ces différentes structures sans l'aide desquelles ce travail n'aurait pas été possible.

Je tiens à remercier tout particulièrement mes deux directeurs de thèse :

Professeur Mamadou Aliou BALDE, Directeur de l'IRDPMAG, un scientifique bienveillant et humble, l'un des piliers de la recherche guinéenne qui contribue activement à la formation des jeunes cadres. Votre accompagnement a été d'une grande utilité dans la poursuite de mes études post-universitaires. C'est avec un cœur plein de gratitude que je vous adresse mes sincères remerciements.

Docteur Agnès AUBOUY, directrice adjointe de l'unité de recherche PHARMADEV (UMR152 IRD/UPS) Toulouse, une amabilité et une efficacité personnifiée, une scientifique d'une grande rigueur et d'une disponibilité constante. Votre modestie, vos immenses qualités scientifiques, intellectuelles et humaines (dont de nombreuses invitations en famille) m'ont beaucoup marquée. Je vous remercie pour votre implication personnelle dans ce travail, vos corrections profondes, vos remarques constructives et l'autonomie que vous m'avez accordée pour acquérir une expérience pratique sur les techniques des tests biologiques.

Par ailleurs, j'exprime mes sincères remerciements au Docteur Mohamed HADDAD, chargé de recherche à l'IRD et responsable de l'équipe Pharmacognosie, Ethnopharmacologie et Pathologies du Sud pour son accueil chaleureux, sa bonne humeur et sa disponibilité constante. Votre accompagnement dans la partie chimique de mon travail m'a été d'une grande utilité.

Toute ma reconnaissance au Professeur Sahar TRAORE, chef du département de chimie pharmaceutique et toxicologie à l'institut de santé publique de Guinée qui a été à l'origine de cette thèse. Merci pour la confiance que vous avez placée en

moi en m'encourageant à poursuivre mes études jusqu'à la thèse. Je vous remercie pour votre générosité, votre accompagnement sans faille et vos précieux conseils.

Mes remerciements particuliers vont à Monsieur Vincent ROUMY, Maître de conférences à l'Université de Lille 2 ainsi qu'à Monsieur David COURTIN, chargé de recherche à l'IRD, d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail ; à Monsieur Alexis VALENTIN et à Madame Sandrine HOUZÉ Professeurs des universités-praticiens hospitaliers qui ont bien voulu être membre du jury.

Un grand merci aux Docteurs Lise Lefèvre et Verena Poinot, membres du comité de suivi de thèse, pour leurs conseils et leur disponibilité tout au long de ce travail.

Je tiens à remercier sincèrement le Docteur Agnès COSTE Responsable de l'équipe de recherche Macrophages et Récepteurs Nucléaires dans l'infection et l'inflammation (MRN2i) pour m'avoir accueillie dans son laboratoire où j'ai pu bénéficier d'excellentes conditions de travail. Merci également pour votre bienveillance et votre contribution au bon déroulement de ce travail.

Mes sincères remerciements vont au Professeur Isabelle FOURASTE pour sa recommandation en vue de ma venue à Toulouse et sa participation dans la réalisation du contrôle botanique.

J'exprime également un grand merci au Professeur Karine REYBIER responsable de l'équipe Mécanisme redox et stress oxydant qui a assuré les tests anti-oxydants.

Je remercie le Professeur El Hadj Saïdou BALDE, Vice Doyen chargé des études de l'université Gamal Abdel Nasser pour tous les services rendus et son soutien moral pendant des moments difficiles.

A Philippe BATIGNE « *On a souvent tendance à dire que la vie est dure et moi je me bats pour le futur, quelle aventure !* », vous m'avez facilité cette aventure grâce à votre assistance précieuse au cours de mes expériences sur les souris. Votre joie de vivre au quotidien fait de vous une personne spéciale.

Une expression de reconnaissance particulière à l'ensemble de l'équipe PHARMADEV pour leur accueil chaleureux, leur bonne humeur et le temps que chacun de ses membres m'ont accordé, plus particulièrement à Bénédicte BERTRAND et aux Docteurs José BERNARD, Hélène AUTHIER, Augustin LE Naour pour leur gentillesse et leurs encouragements.

Une mention spéciale à mes compagnons thésards : Mélissa PARNY, Marie SALON, Mouna RAHABI, Jade ROYO, Godefroy JACQUEMIN, et post-doctorants Mélissa PRAT, Mohamed HALADDINE. Vous avez été parmi mes plus belles rencontres durant ces années d'étude. Nous n'avons pas été que de simples collègues, mais des amis travaillant ensemble et partageant les moments de joies et de peines. Soyez sincèrement remerciés pour toutes ces années de complicité académique, d'amour, d'entraide, de soutien au quotidien et de partage. Je vous souhaite une carrière aussi brillante que fructueuse et espère que nos relations se poursuivront au-delà du cadre académique.

Un grand merci à mon compagnon de lutte, Mamadou Aliou BALDE thésard à l'Université d'Anvers, pour sa disponibilité et ses précieux conseils.

Tous mes encouragements à Kimberley Coulson et Clément Blot pour le bon déroulement de leurs thèses.

A mes amies fidèles, Minétou HAIDARA et Nènè Aissata SOW, je vous remercie pour votre présence permanente à mes côtés et votre soutien sans faille.

Je ne peux m'empêcher de remercier le Docteur Alpha Oumar BALDE pour sa générosité durant mes travaux à Dubréka.

Par-dessus tout, je remercie le Très-Haut, le DIEU Tout-Puissant, Créateur de toutes choses et Source de toute vie.

Enfin, j'exprime ma reconnaissance à toutes celles et à tous ceux qui, de près ou de loin, m'ont apporté une assistance au cours de cette expérience académique.

Table des matières

Liste des figures	7
Liste des tableaux	9
Liste des abréviations	10
Introduction générale	12
I. Généralités	14
1. Définition du paludisme et historique	14
2. Prévalence et épidémiologie	14
3. Parasite et agent vecteur	15
3.1. Agent pathogène	15
3.1.1. <i>Plasmodium falciparum</i>	15
3.1.2. <i>Plasmodium vivax</i>	16
3.1.3. <i>Plasmodium ovale</i>	16
3.1.4. <i>Plasmodium malariae</i>	16
3.1.5. <i>Plasmodium knowlesi</i>	17
3.2. Agents vecteurs	17
4. Cycle biologique du parasite	19
4.1. Phase asexuée chez l'Homme	19
4.1.1. Phase intra-hépatique ou pré-érythrocytaire	19
4.1.2. Phase intra-érythrocytaire : schizogonie endoérythrocytaire	19
4.2. Phase sexuée chez l'anophèle	20
5. Diagnostic clinique et biologique du paludisme	21
5.1. Diagnostic clinique	21
5.1.1. Paludisme simple	21
5.1.2. Paludisme grave	22
5.1.3. Paludisme gestationnel	22
5.2. Diagnostic biologique	22
5.2.1. Goutte épaisse et frottis sanguin	22

5.2.2.	<i>Quantitative Buffy Coat (QBC malaria test®)</i>	23
5.2.3.	<i>Test de diagnostic rapide (TDR)</i>	23
5.3.	Diagnostic moléculaire.....	23
5.3.1.	<i>Technique de Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	24
5.3.2.	<i>Technique Loop-Mediated Isothermal Amplification</i>	24
6.	Luttes antivectorielles	24
6.1.	Lutte anti larvaire	25
✓	La méthode physique.....	25
✓	La méthode chimique	25
✓	La méthode biologique	25
✓	La méthode génétique.....	25
6.2.	Lutte contre les vecteurs au stade adulte	26
✓	La pulvérisation intra-domiciliaire à effet rémanent.....	26
✓	Pulvérisation spatiale.....	26
6.3.	Réduction du contact homme-vecteur.....	26
7.	Lutte antiplasmodiale	27
7.1.	Les antipaludiques naturels.....	27
7.1.1.	<i>Quinine</i>	27
7.1.2.	<i>Artémisinine</i>	28
7.2.	Les antipaludiques de synthèse.....	29
7.2.1.	<i>Dérivés de la quinine</i>	29
Les 4-aminoquinoléines.....		29
Les 8-aminoquinoléines.....		30
Les aryl-amino-alcools		31
7.2.2.	<i>Les inhibiteurs des acides nucléiques</i>	32
Les antifolates		32
Les antibiotiques		34
7.2.3.	<i>Dérivés de l'artémisinine</i>	34
8.	Les différents types de prise en charge	36
8.1.	La prévention pour les voyageurs	36
8.2.	La prévention des populations vivant en zone d'endémie.....	36
8.3.	Traitement curatif du paludisme non compliqué	37
8.4.	Traitement chez la femme enceinte.....	37
8.5.	Traitement du paludisme grave.....	37

9. Résistance des parasites aux antipaludiques.....	38
II. Pathogénèse et immunité anti palustre	40
1. Physiopathologie générale du paludisme à <i>P. falciparum</i>	40
2. Pathogénèse du neuropaludisme (ou paludisme cérébral)	40
3. Modèles murins de paludisme	42
3.1. Modèles de paludisme simple.....	43
3.2. Modèles de neuropaludisme	44
4. Immunité antipalustre.....	46
4.1. Immunité innée	46
4.1.1. <i>Monocytes/macrophages</i>	47
✓ Polarisation des macrophages	47
✓ Implication des monocytes/macrophages dans la réponse antipalustre	48
4.1.2. <i>Cellules dendritiques</i>	49
4.1.3. <i>Cellules Natural Killers (NK)</i>	50
4.1.4. <i>Cellules Natural Killer T (NKT)</i>	51
4.1.5. <i>Lymphocytes T$\gamma\delta$</i>	51
4.2. Immunité adaptative	52
4.2.1. <i>Immunité à médiation cellulaire</i>	52
Rôle des lymphocytes T CD4	52
Rôle des lymphocytes T CD8	54
Rôle des cytokines dans le paludisme	55
✓ Le TNF	55
✓ L'IFN γ	56
✓ L'IL-12	56
✓ L'IL-10 et le TGF β	57
4.2.2. <i>Immunité à médiation humorale</i>	58
III. Paludisme et Médecine traditionnelle en Afrique de l'Ouest	60
1. Définition de la médecine traditionnelle	60
2. Méthodes d'évaluation de l'activité de plantes antipaludiques	60

✓ L'approche ethnopharmacologique	60
✓ L'approche par sélection chimiotaxonomique	62
3. Médecine traditionnelle et plantes antipaludiques utilisées en Afrique de l'Ouest	62
3.1. Au Nigéria	63
3.2. Au Mali	64
3.3. Au Ghana	64
3.4. Au Burkina Faso	65
3.5. Au Bénin	65
3.6. En Côte d'Ivoire	66
3.7. Au Togo	66
3.8. Au Niger et Sénégal	66
4. Exemple de plantes consommées sous forme de Médicaments Traditionnels Améliorés (MTA)	68
5. Le cas de la Guinée	69
5.1. Données géographiques	69
5.2. Prévalence et épidémiologie du paludisme en Guinée	70
5.3. Paludisme et médecine traditionnelle en Guinée	71

IV. Travaux personnels

Chapitre 1 : Etude de l'activité antipaludique de trois plantes issues de la médecine traditionnelle guinéenne

1. Introduction	72
2. Matériel et Méthodes	72
2.1. Matériel végétal	72
2.2. Matériel biologique	73
2.3. Matériel animal	73
2.4. Méthode d'extraction	73
2.5. Prélèvement des macrophages et test de cytotoxicité <i>in vitro</i> des extraits	74
2.6. Activité antiplasmodiale <i>in vitro</i>	75
2.7. Activité antipaludique <i>in vivo</i>	75
2.8. Analyses statistiques	76
3. Résultats	76

3.1. Activité <i>in vitro</i> antiplasmodiale et cytotoxicité des extraits.....	76
3.2. Evaluation <i>in vivo</i> de l'activité des extraits de plantes contre les souches <i>P. chabaudi chabaudi</i> (<i>Pcc</i>) et <i>P. berghei ANKA</i> (<i>PbA</i>).....	77
3.3. Effet des extraits de plantes sur le poids des souris infectées avec <i>Pcc</i> et <i>PbA</i>	81
4. Discussion.....	83
5. Conclusion.....	86

Chapitre 2 : Etude de l'activité antipaludique et immunomodulatrice de

<i>T. albida</i> Dubréka	87
1. Introduction.....	87
2. Matériel et méthodes.....	88
2.1. Toxicité aiguë.....	88
2.2. Activité antiplasmodiale <i>in vivo</i>	88
2.3. Mise en évidence des populations cellulaires par cytométrie en flux	88
2.4. Expression génique de marqueurs pro- et anti-inflammatoires dans le cerveau des souris.....	89
2.5. Niveaux de cytokines dans les cerveaux des souris.....	89
2.6. Expression génique de marqueurs pro- et anti-inflammatoires par des macrophages murins après activation <i>in vitro</i> au LPS/IFN γ	90
2.7. Niveaux de cytokines produites par les macrophages murins activés <i>in</i> <i>vitro</i> au LPS/IFN γ	93
2.8. Modèle <i>in vitro</i> de production de ROS et activité anti-oxydante de <i>Terminalia albida</i>	93
2.9. Analyse UHPLC-HRMS.....	93
2.10. Analyses statistiques.....	94
3. Résultats et discussion.....	94

Chapitre 3 : Etude déréplicative des échantillons de *T. albida*.....

1. Introduction.....	103
2. Matériels et méthodes.....	103
2.1. Equipement d'UHPLC-HRMS.....	103
2.2. Conditions d'analyse.....	104

2.3. Traitement des données et analyse statistique	104
3. Résultats et discussion.....	105
Chapitre 4 : Etude botanique des échantillons de <i>Terminalia albida</i>	
Scott-Elliot (Combretaceae)	113
1. Introduction	113
2. Matériel et Méthode.....	113
2.1. Analyse macroscopique.....	113
2.2. Analyse microscopique	113
2.2.1. <i>Section transversale</i>	113
2.2.2. <i>Drogue pulvérisée</i>	114
3. Résultats	114
3.1. Description macroscopique	114
3.2. Description microscopique des coupes transversales d'écorce de tige ...	116
3.3. Description microscopique de la poudre des écorces de tige	120
4. Discussion et Conclusion	123
V. Conclusion et perspectives	124
Références.....	126
Annexe	153

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Cas de paludisme répertoriés en 2017 dans le monde selon l’OMS	15
Figure 2 : <i>Anopheles gambiae</i> (a) et gîte larvaire (b),	18
Figure 3 : Répartition mondiale des vecteurs du paludisme	18
Figure 4 : Cycle biologique du paludisme à <i>Plasmodium spp</i> (Source CDC).....	21
Figure 5 : Structure chimique de la quinine.....	28
Figure 6 : Structure chimique de l’artémisinine.....	28
Figure 7 : Structure chimique de la chloroquine	29
Figure 8 : Structure chimique de l’amodiaquine	30
Figure 9 : Structure chimique de la primaquine.....	30
Figure 10 : Structure chimique de la méfloquine.....	31
Figure 11 : Structure chimique de l’halofantrine	32
Figure 12 : Structure chimique du proguanil	33
Figure 13 : Structure chimique de la pyriméthamine	33
Figure 14 : Structure chimique de la sulfadoxine	34
Figure 15 : Structures chimiques de l’artémisinine et des dérivés.....	35
Figure 16 : Répartition mondiale de la résistance du <i>Plasmodium falciparum</i> aux médicaments antipaludiques	39
Figure 17 : Mécanismes physiopathologiques du paludisme cérébral	42
Figure 18 : Immunité innée et adaptative du paludisme au stade sanguine.....	59
Figure 19 : Approches méthodologiques conduisant à la valorisation d’extraits de plantes ou de composés issus de plantes.....	60
Figure 20 : Carte de la République de Guinée avec les régions administratives	70
Figure 21 : Schéma d’extraction général des différentes espèces.....	74
Figure 22 : Effet des extraits dichlorométhane de <i>Desmodium velutinum</i> et <i>Rourea minor</i> dans l’infection à <i>P. berghei ANKA</i> et <i>P. chabaudi chabaudi</i>	80
Figure 23 : Effet des extraits méthanoliques de <i>Terminalia albida</i> en provenance de Kankan et Dubréka dans l’infection à <i>P. berghei ANKA</i> et <i>P. chabaudi chabaudi</i>	81
Figure 24 : Niveau de cytotoxicité de <i>Terminalia albida</i> vis-à-vis de macrophages péritonéaux murins sains par le test de la lactate déshydrogénase (LDH)	91

Figure 25 : Test de toxicité aigue <i>in vivo</i> : effet de <i>Terminalia albida</i> sur le poids des souris.....	94
Figure 26 : Rapid Murine Cerebral Behaviour Scale (RMCBS) : effet de <i>Terminalia albida</i> sur les fonctions cérébrales des souris infectées par <i>P. berghei ANKA</i>	95
Figure 27 : Effet de <i>Terminalia albida</i> sur l'infiltration cellulaire dans les cerveaux de souris infectées par <i>P. berghei ANKA</i>	96
Figure 28 : Effet de <i>Terminalia albida</i> sur l'expression de marqueurs pro et anti-inflammatoires dans les cerveaux de souris infectées par <i>P. berghei ANKA</i>	97
Figure 29 : Etude <i>in vitro</i> des propriétés anti-inflammatoires de <i>Terminalia albida</i>	100
Figure 30 : Evaluation de l'effet antioxydant cellulaire de <i>Terminalia albida</i> par la méthode LUCS.....	101
Figure 31 : Structures chimiques des 9 composés spécifiques de <i>T. albida</i> Dubréka identifiés par déréplication.....	112
Figure 32 : <i>Terminalia albida</i> Scott-Elliot	115
Figure 33 : <i>T. albida</i> Scott-Elliot écorce de tige (a) Kankan ; (b) Dubréka	116
Figure 34 : <i>T.albida</i> Scott-Elliot : Section transversale de l'écorce de tige (privée du suber) - Aspect général	117
Figure 35 : <i>T. albida</i> Scott-Elliot : Section transversale de la partie externe de l'écorce de tige	118
Figure 36 : <i>T. albida</i> Scott-Elliot : Section transversale de l'écorce de tige (photos successivement prises de l'intérieur vers l'extérieur)	119
Figure 37 : <i>T. albida</i> Scott-Elliot : détails de la section transversale de l'écorce de tige ...	119
Figure 38 : <i>T. albida</i> Scott-Elliot : Examen microscopique de la poudre d'écorce de tige	120
Figure 39 : <i>T.albida</i> Scott-Elliot : Suber vu de face.....	121
Figure 40 : <i>T.albida</i> Scott-Elliot : Les macles d'oxalate de calcium dans la poudre d'écorce de tige	121
Figure 41 : <i>T.albida</i> Scott-Elliot : Différentes formes de cellules scléreuses dans la poudre d'écorce de tige.....	122
Figure 42 : <i>T.albida</i> Scott-Elliot : Présence de graines dans la poudre d'écorce de tige ..	122
Figure 43 : UHPLC-HRMS en mode ESI déréplication par MS-Finder : chromatogramme en mode négatif.....	158

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caractéristiques biologiques et physiologiques des macrophages M1 et M2 observés chez l'homme et la souris.....	48
Tableau 2 : Principales molécules isolées à partir de plantes utilisées en médecine traditionnelle dans le traitement du paludisme	67
Tableau 3 : Exemples de plantes consommées sous forme de Médicaments Traditionnels Améliorés (MTA).....	68
Tableau 4 : Activité antiplasmodiale et cytotoxique <i>in vitro</i> des extraits de <i>D. Velutinum</i> , <i>R. minor</i> et <i>T. albida</i>	77
Tableau 5 : Pourcentage d'inhibition de la densité parasitaire chez les souris infectées avec <i>P. chabaudi chabaudi</i> ou <i>P. berghei ANKA</i> après traitement avec les extraits de plantes guinéennes.....	79
Tableau 6 : Effet des extraits sur le poids des souris C57BL/6 infectées avec <i>P. chabaudi chabaudi</i> ou <i>P. berghei ANKA</i>	82
Tableau 7 : Séquences d'amorces murines utilisées dans les expériences quantitatives de RT-qPCR	92
Tableau 8 : Analyses déréplicatives des extraits méthanoliques de <i>TaD</i> et <i>TaK</i> par HRMS et MS/MS en utilisant les bases de données MS finder et DNP	108
Tableau 9 : Activité antiprotozoaire et cytotoxique <i>in vitro</i> de 41 extraits de plantes.....	154

LISTE DES ABREVIATIONS

- ADN : Acide désoxyribonucléique
- ACT : Artemisinin Combination Therapy
- CC₅₀ : Concentration cytotoxique à 50%
- CD : Cluster of Differentiation
- CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
- CR1 : Récepteur du complément 1
- CSA : Chondroïtin sulfate A
- DC : Cellules Dendritiques
- DDT : Dichlorodiphényltrichloroéthane
- ECM : Experimental Cerebral Malaria
- GPI : Glycosylphosphatidylinositol
- ICAM-1 : Intercellular Adhesion protein 1
- IC₅₀ : Concentration Inhibitrice à 50%
- IFN γ : Interferon gamma
- IL : Interleukine
- IRDPMAG : Institut de Recherche et de Développement des Plantes Médicinales et Alimentaires de Guinée
- LAMP : Loop-Mediated Isothermal Amplification
- LDH : Lactate déshydrogénase
- LPS : Lipopolysaccharide
- MID : Moustiquaire à Imprégnation Durable
- MII : Moustiquaire Imprégnée d'Insecticide
- MTA : Médicaments Traditionnels Améliorés
- NKT : Natural Killer T
- OMS : Organisation Mondiale de la Santé
- PbA : *Plasmodium berghei ANKA*
- Pcc : *Plasmodium chabaudi chabaudi*
- PCR : Polymerase Chain Reaction
- PfEMP1: *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein-1
- pH : Potentiel hydrogène

PNLP : Programme National de Lutte contre le Paludisme

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

ROS : Reactive Oxygen Species

TDR : Test de diagnostic rapide

TGF β : Transforming growth factor beta

Th1 : T helper 1

TLR : Toll-like Receptor

TNF : Facteur de nécrose tumorale α

VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion protein 1

Introduction générale

Dans la majeure partie des pays du sud, la prise en charge des questions sanitaires constitue un véritable problème en raison de l'insuffisance des médicaments généralement importés et la faiblesse du système économique qui accentuent la difficulté d'accès aux soins. En outre, ces pays doivent faire face à l'émergence de nouvelles pathologies et à une diminution de l'efficacité de certains médicaments. Pour pallier ces difficultés, une solution consiste à valoriser les ressources locales pour une meilleure prise en charge des pathologies les plus préoccupantes, dont le paludisme.

Maladie infectieuse potentiellement mortelle, le paludisme demeure la première préoccupation médicale de bien des pays du monde, principalement en Afrique subsaharienne. Les couches vulnérables sont principalement les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes. Malgré une amélioration de la prise en charge du paludisme, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), dans son onzième rapport, souligne que les objectifs pour réduire le paludisme de 40% d'ici à 2020 ne seront pas atteints (OMS, 2018a).

En Guinée, bien que le Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) rapporte une baisse du taux de prévalence du paludisme, il reste encore la première cause de mortalité (36%) et de morbidité (40,82%) dans les structures sanitaires du pays (OMS, 2017).

L'efficacité décroissante de l'arsenal thérapeutique antipaludique due à la pharmaco-résistance explique en partie cette augmentation inquiétante de la morbidité et mortalité palustre (Naß and Efferth, 2019). De nos jours, les dérivés d'artémisinine utilisés en association avec une autre molécule antipaludique (« artemisinin combination therapy », ACT) constituent le traitement de première intention. Leur efficacité réside en l'action combinée de deux types de médicaments à demi-vie et de mécanismes d'action distincts. Cependant, l'utilisation de ces médicaments est menacée par le développement de la résistance à l'artémisinine en Asie du Sud-Est qui se manifeste par une clairance parasitaire retardée après traitement (Ashley et al., 2014; Fairhurst and Dondorp, 2016; Ougi et al., 2018). L'émergence d'isolats résistants en Afrique est sous surveillance, et de récentes études font état de la réduction du délai d'élimination des parasites après traitement chez quelques isolats parasitaires originaires d'Afrique de l'Ouest (Ikeda et al., 2018; Lu et al., 2017).

Face à cet épineux problème, il est nécessaire d'engager des efforts constants pour développer de nouveaux médicaments antipaludiques efficaces et à moindre coût.

Rappelons que les plantes constituent une voie prometteuse dans le domaine de la thérapie. Plus de 50% des médicaments autorisés sur le marché sont d'origine naturelle ou semi-synthétique

(Newman and Cragg, 2016). C'est le cas, entre autres, de la quinine extraite de l'écorce de *Cinchona*, qui a permis par la suite la synthèse des composés quinoléïques notamment la chloroquine, l'amodiaquine et la méfloquine. Plus récemment, la découverte de l'artémisinine, extraite d'une Astéracée originaire de Chine (*Artemisia annua*), a conduit au développement de toute une série de dérivés semi-synthétiques (Bray et al., 2005).

En Guinée, dans le but de répondre aux multiples problèmes de santé de la population et de contribuer à l'effort de recherche dans le domaine du paludisme, de nombreux travaux de recherche sont menés par l'Institut de Recherche et de Développement des Plantes Médicinales et Alimentaires de Guinée (IRDPMAG).

Pour le paludisme, des enquêtes ethnobotaniques, ethnomédicales ont été réalisées par l'IRDPMAG dans les quatre régions de la Guinée. A l'issue de ces enquêtes, 113 espèces d'intérêt ont été recensées dont 109 espèces identifiées sur le plan botanique et classées dans 84 genres et 46 familles (Traore et al., 2013). Pour une validation de leur usage traditionnel, les 41 espèces les moins étudiées dans la littérature ont été soumises à un screening biologique *in vitro*. Les résultats obtenus ont montré des activités biologiques remarquables pour *Terminalia albida* ($IC_{50} = 0,6 \mu\text{g/mL}$), *Desmodium velutinum* ($IC_{50} = 0,25 \mu\text{g/mL}$) et *Rourea minor* ($IC_{50} = 0,4 \mu\text{g/mL}$) contre la souche de *Plasmodium falciparum* chloroquino-résistante PfK1 (Traore et al., 2014).

Ces résultats préliminaires ont permis de cibler ces trois plantes et d'envisager la poursuite des travaux de recherche visant à valider les usages traditionnels conférés à ces plantes.

Les présents travaux visent à évaluer les activités antipaludiques de *Terminalia albida*, *Desmodium velutinum* et *Rourea minor* dans un modèle murin et déterminer leur impact sur la modulation de l'immunité.

I. Généralités

1. Définition du paludisme et historique

Le paludisme, autrement appelé « malaria », veut dire "mauvais air". C'est une infection tropicale due à un protozoaire du genre *Plasmodium* transmis à l'homme par un moustique du genre *Anopheles*. Ce parasite a longtemps sévi en Europe où il fait des ravages et, à partir du XVI^e siècle, s'est diffusé aux Amériques avec le développement du commerce d'esclaves.

Déjà connu par les Indiens d'Amérique du Sud pour ses propriétés fébrifuges, ce n'est qu'au XVII^e siècle que le quinquina a été apporté en Europe pour soulager de nombreuses personnalités de la cour du roi Louis XIV (Bickel, 1951; Drugs et al., 2004). Mais il a fallu attendre l'année 1820 pour que Pelletier et Caventou en isolent le principe actif, en l'occurrence la quinine qui resta le seul traitement contre cette maladie pendant plus d'un siècle. Par ailleurs, la cause de la maladie a été découverte en 1880 à Constantine par un médecin de l'armée française, Alphonse Laveran, qui reçut le prix Nobel de médecine et de physiologie en 1907. En 1897, le Britannique Ronald Ross découvre que les moustiques anophèles sont les vecteurs du paludisme (Drugs et al., 2004). Les antimalariques de synthèse, notamment la chloroquine, sont découverts en 1940 et seront alors très largement utilisés. Mais la résistance à ce produit apparaît dès 1960 en Amérique du Sud et en Asie du Sud-Est ; elle se propage rapidement dans toutes les zones d'endémie à partir des années 2000 (Chen, 2014).

2. Prévalence et épidémiologie

Le paludisme, maladie parasitaire à transmission vectorielle, sévit dans les régions intertropicales dont l'Afrique subsaharienne qui supporte la plus grande part de la charge mondiale. Selon le dernier rapport de l'OMS, 1,2 milliard de personnes courent un risque élevé à travers le monde avec une incidence supérieure à 100 pour 1000 habitants dans certaines régions d'Afrique tandis que dans d'autres régions du monde, particulièrement en Amérique et en Asie, l'incidence est de 0,1 à 10 pour 1000 habitants (OMS, 2014).

Malgré de nombreux progrès réalisés dans la lutte contre ce fléau, 219 millions de cas sont rapportés annuellement dans le monde dont 92% ont été enregistrés pour 2017 en Afrique, loin devant la région Asie du Sud-est (5%) et la région Méditerranée orientale (2%) (**Figure 1**). Sur 435 000 cas de décès, 93% sont survenus en Afrique subsaharienne en 2017. Dans ce continent, 99,7% des décès sont imputables à l'espèce *P. falciparum* (OMS, 2018a). Les enfants de moins de 5 ans sont les plus vulnérables face au paludisme. Ils ont représenté 61 % des décès associés

I. Généralités

au paludisme à travers le monde. Si on note une baisse significative de l'incidence dans le monde ces deux dernières années, certaines régions de l'OMS notamment l'Amérique Centrale, l'Amérique du Sud et l'Afrique n'ont pas connu ce progrès (OMS, 2018a).

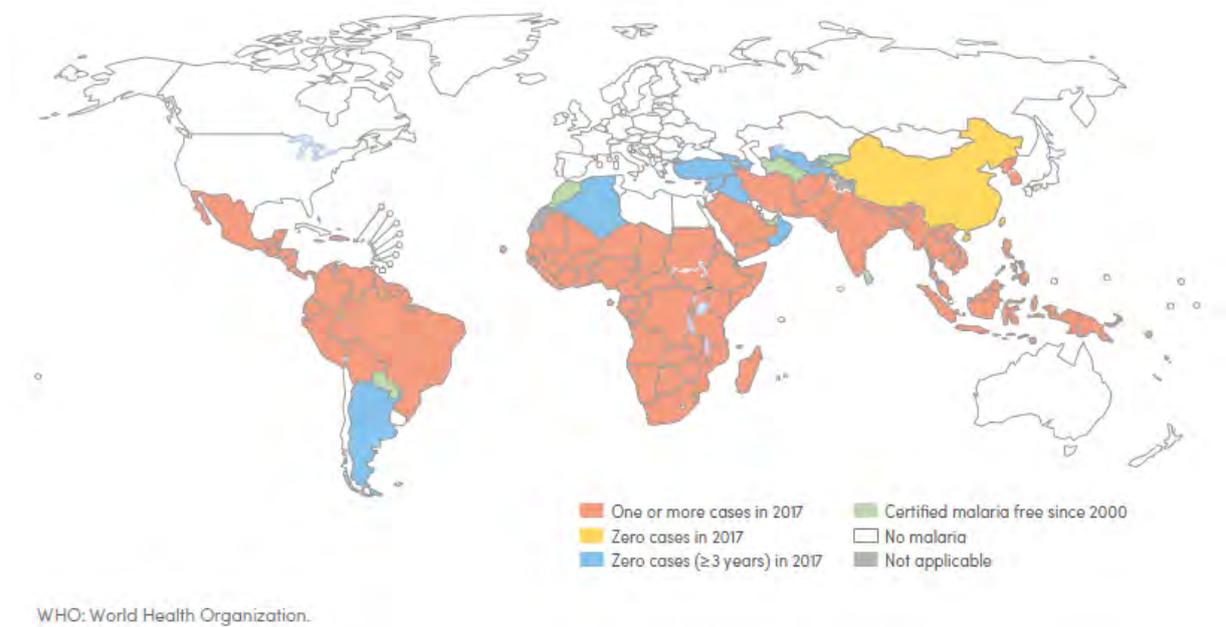


Figure 1 : Cas de paludisme répertoriés en 2017 dans le monde selon l'OMS (OMS, 2018a).

3. Parasite et agent vecteur

3.1. Agent pathogène

Le paludisme est transmis par un protozoaire appartenant au genre *Plasmodium*. Le genre *Plasmodium* est un eucaryote unicellulaire qui relève du phylum Apicomplexa, désigné ainsi à cause du complexe apical permettant de coloniser les cellules hôtes. Il existe une centaine d'espèces de *Plasmodium* dont cinq sont impliquées en pathologie humaine : *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* et *P. knowlesi*.

3.1.1. *Plasmodium falciparum*

Parmi les cinq espèces précitées, *P. falciparum* constitue l'espèce la plus redoutable et la plus présente parmi les principales causes de mortalité dans les pays à faible revenu (Gething et al., 2016). Bien que d'autres espèces soient endémiques dans certaines régions, les efforts de recherche sont beaucoup plus concentrés sur *falciparum*. On la rencontre dans la région Afrique de l'OMS (99,7%), en Asie du Sud-Est (62,8%), en Méditerranée orientale (69%) et au

I. Généralités

Pacifique occidental (71,9%) (OMS, 2018a). Elle est responsable des formes cliniques potentiellement mortelles et des cas de chimiorésistance compliquent son éradication (Ashley et al., 2014; Idro et al., 2005). Le cycle intra-érythrocytaire dure environ 48 heures au cours duquel le parasite évolue en différents stades jusqu'aux stades sexués qui permettent la poursuite du cycle (voir paragraphe 4).

3.1.2. *Plasmodium vivax*

P. vivax, souvent négligé, est la plus répandue des cinq espèces de *Plasmodium* connue pour causer le paludisme chez l'homme (Gething et al., 2012). Bien que l'incidence de *P. vivax* semble être très faible en Afrique par manque d'expression de l'antigène de Duffy (récepteur membranaire nécessaire à l'invasion de *P. vivax*) sur les globules rouges dans ces populations (Miller et al., 1976), des cas d'infection à *P. vivax* ont récemment été observés chez des africains Duffy-négatifs (Albsheer et al., 2019; Gunalan et al., 2018). La pathologie causée par *P. vivax* est souvent considérée comme une maladie bénigne. Toutefois, des manifestations graves et mortelles ont été rapportées chez des patients atteints d'infection à *P. vivax* (Rifakis et al., 2008). En outre, des accès de reviviscence dus à une réactivation des formes dormantes, ou hypnozoïtes, peuvent se produire plusieurs mois ou années après la primo-infection et donner lieu à une infection symptomatique (Durante Mangoni et al., 2003).

3.1.3. *Plasmodium ovale*

Sévissant surtout en zone intertropicale africaine et en Asie, *P. ovale* peut être également sous forme quiescente dans les hépatocytes et conduire à des rechutes (Collins and Jeffery, 2005). Cette espèce est composée de deux sous-espèces sympatriques, *P. ovale curtisi* et *P. ovale wallikeri* que Sutherland et al. ont nommé « type classique » et « type variant » respectivement en raison de leur distinction génétique (Ansari et al., 2016; Sutherland et al., 2010). En terme de manifestation clinique, il a été démontré que l'infection à *P. ovale wallikeri* est accompagnée de signes cliniques sévères avec un temps d'incubation plus court alors que l'infection à *P. ovale curtisi* est bénigne (Zaw and Lin, 2017).

3.1.4. *Plasmodium malariae*

On le retrouve en Afrique subsaharienne, en Asie du Sud-Est, dans les îles du Pacifique occidental et en Indonésie. Cette espèce a un cycle de vie plus long que *P. falciparum* (72 heures) avec une densité parasitaire généralement plus faible que celle des autres espèces. *P.*

I. Généralités

malariae est capable d'entraîner des reviviscences très tardives, jusqu'à 20 ans à partir du stade sanguin (Collins and Jeffery, 2007).

3.1.5. *Plasmodium knowlesi*

P. knowlesi, isolé à partir de singe à longue queue (macaque) originaire d'Asie du Sud-Est, a récemment été reconnu comme une cause du paludisme zoonotique chez l'homme. La manifestation de l'infection peut favoriser la séquestration des érythrocytes infectés conduisant ainsi à une forme grave du paludisme (Cox-Singh and Singh, 2008; Millar and Cox-Singh, 2015).

3.2. Agents vecteurs

Les vecteurs du *Plasmodium* appartiennent au genre *Anophèles* (**Figure 2a**) qui fait partie de la famille des *Culicidae* de l'ordre des diptères (deux ailes). Il existe plus de 450 espèces d'anophèles. Parmi ces espèces, 70 sont vectrices de différents *Plasmodium* dont une cinquantaine, répartie à travers le monde (**Figure 3**), est responsable de la majorité des infections palustres chez l'homme, et plus particulièrement l'anophèle femelle (Harbach, 2004; Hay et al., 2010). A la différence des mâles, les anophèles femelles ne s'accouplent qu'une seule fois au cours de leur existence et conservent le sperme dans des spermathèques. Ainsi, elles ont besoin d'éléments protéiques comme l'hémoglobine pour la maturation de leurs œufs (ovocytes) ; d'où la nécessité de repas sanguins chez l'homme ou l'animal qui s'effectuent du crépuscule jusqu'au lever du jour. Après maturation, les œufs sont déversés dans les gîtes larvaires (**Figure 2b**) préférentiellement en eau douce, non polluée et peu agitée. Ces gîtes sont propices en fonction de la nature du sol, de l'aménagement des sites par l'homme et de la pluviométrie. La température ambiante constitue un facteur clé dans la durée de leur cycle de développement de l'œuf à l'adulte (OMS, 2013; Pages et al., 2007). Les moustiques à caractère anthropophile (préférence du repas sanguin chez l'homme plutôt que chez l'animal) sont souvent attirés par l'odeur corporelle (ammoniac, acide lactique et acide carboxylique) ou la présence de gamétocytes dans le sang humain (Lacroix et al., 2005; Smallegange et al., 2005).

I. Généralités



Figure 2 : *Anopheles gambiae* (a) et gîte larvaire (b), d'après Pages, Orlandi-Pradines, et Corbel 2007.

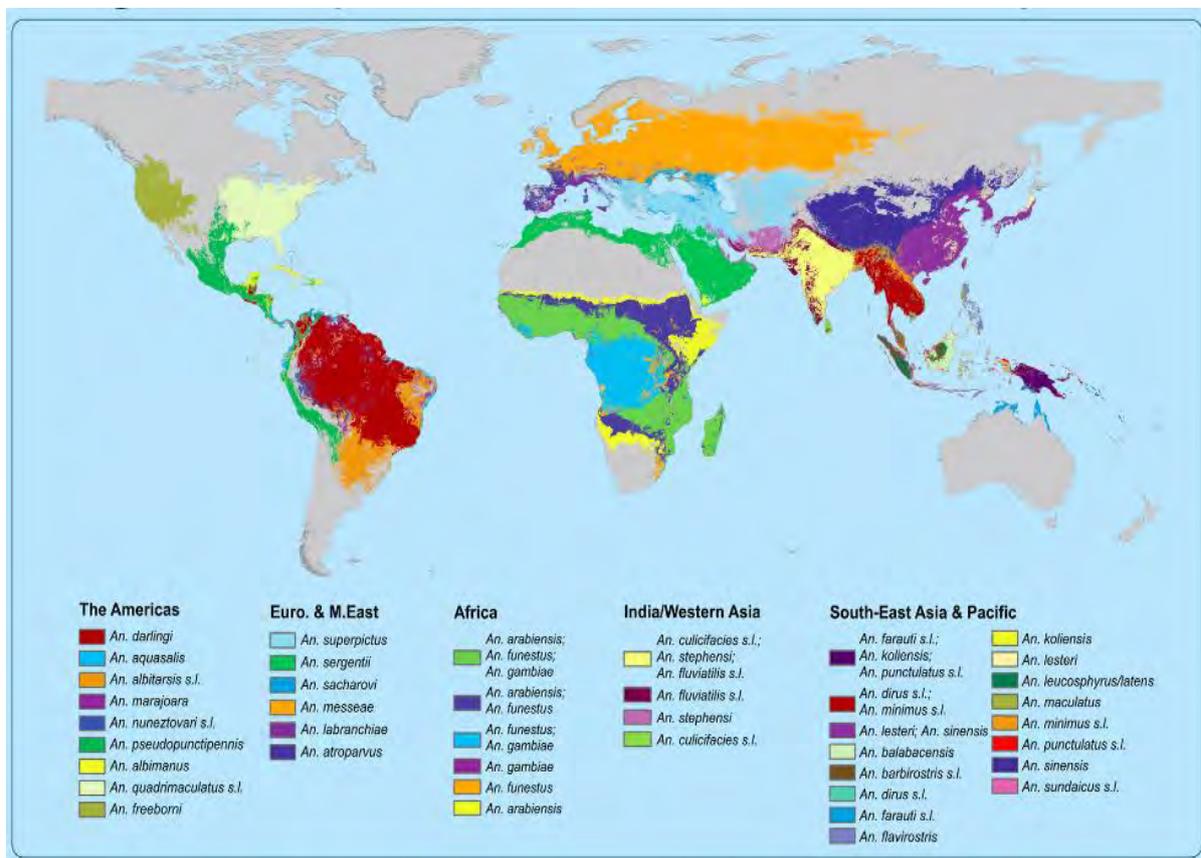


Figure 3 : Répartition mondiale des vecteurs du paludisme (OMS, 2013).

4. Cycle biologique du parasite

Les recherches entreprises ces dernières années pour mettre au point de nouveaux médicaments et des vaccins antipaludiques ont considérablement enrichi la connaissance de la biologie du parasite. Le cycle de vie du parasite se déroule chez deux hôtes : l'homme ou hôte intermédiaire (phase asexuée ou schizogonies), et le moustique du genre anophèle ou hôte définitif (phase sexuée ou sporogonie). Chez l'homme, ce cycle se déroule également en deux phases : une phase hépatique ou pré-érythrocytaire (asymptomatique) et une phase sanguine ou intra-érythrocytaire.

4.1. Phase asexuée chez l'Homme

4.1.1. *Phase intra-hépatique ou pré-érythrocytaire*

Par sa salive, l'anophèle femelle inocule les parasites sous forme de sporozoïtes dans la peau de l'hôte (**Figure 4**). De nombreux sporozoïtes envahissent les hépatocytes où ils se multiplient par divisions cellulaires pendant 6 à 7 jours pour former des schizontes. Cette phase pré-érythrocytaire est asymptomatique et obligatoire. A maturité, les schizontes hépatiques se lisent et libèrent des mérozoïtes dans la circulation, et c'est ainsi que commence la phase érythrocytaire.

Pour certaines espèces (*P. ovale*, *P. vivax*), l'infection hépatique peut devenir latente (formes hypnozoïtes) et permettre au parasite de survivre longtemps dans l'organisme. Ces formes latentes sont à l'origine des récurrences qui peuvent survenir des semaines, voire des années plus tard (Vaughan et al., 2008; White et al., 2014).

4.1.2. *Phase intra-érythrocytaire : schizogonie endoérythrocytaire*

Après leur libération dans la circulation, les mérozoïtes hépatiques vont rapidement envahir les érythrocytes et résider dans des vacuoles parasitophores où ils vont initier leur maturation (Cowman and Crabb, 2006). Peu de temps après l'invasion, les mérozoïtes se différencient en trophozoïtes et se multiplient par reproduction asexuée appelée schizogonie. A ce stade, le parasite se nourrit du contenu des globules rouges pour son développement. Il modifie la membrane cellulaire de ces derniers en y insérant des protéines parasitaires pour découper l'hémoglobine et détoxifie par polymérisation les produits de dégradation tels que l'hème sous forme des cristaux inertes appelés hémozoïne (White et al., 2014). Pour la suite du cycle, le trophozoïte entame une série de mitoses jusqu'à la formation d'un schizonte mature (rosace) qui éclate en rompant la membrane du globule rouge pour libérer, selon l'espèce, de 8 à 32

I. Généralités

mérozoïtes (Cowman and Crabb, 2006). Les mérozoïtes libérés vont parasiter d'autres globules rouges et le cycle asexué recommence. Les manifestations cliniques apparaissent à cette phase, notamment l'anémie, la fièvre et des vomissements (Bartoloni and Zammarchi, 2012; White, 2018). Ce cycle érythrocytaire est de 24 heures pour *P. knowlesi*, de 48 heures pour *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. ovale* (fièvre tierce) et de 72 heures pour *P. malariae* (fièvre quarte). Après plusieurs cycles schizogoniques, certains trophozoïtes asexués, sous l'effet du stress, se différencient en gamétocytes mâles et femelles et circulent hors des hématies dans la circulation sanguine (White et al., 2014).

4.2. Phase sexuée chez l'anophèle

Lors de son repas sanguin chez une personne impaludée (**Figure 4**), l'anophèle femelle ingère des gamétocytes à potentiel sexuel mâle et femelle. Dans la lumière intestinale du moustique, la différenciation de ces gamétocytes en gamètes est favorisée par la présence d'acide xanthurénique (issu du métabolisme du tryptophane du moustique), une diminution de température d'environ 5°C et d'un pH basique. Ainsi, les gamétocytes femelles se transforment en macrogamètes tandis que les gamétocytes mâles répliquent leur génome en trois cycles passant d'haploïde à octaploïde pour donner 8 microgamètes flagellés selon le processus appelé exflagellation (Bennink et al., 2016; Sologub et al., 2011). La fécondation d'un macrogamète par un microgamète donne naissance à un zygote (diploïde) qui se développe ensuite pour former un ookinète mobile. Cet ookinète traverse la paroi de l'estomac pour se loger dans la couche laminaire basale en formant un oocyste à l'intérieur duquel s'individualisent les sporozoïtes. A maturité, l'oocyste éclate et libère des milliers de sporozoïtes qui vont migrer pour gagner les glandes salivaires en vue de leur dissémination dans un hôte humain lors du prochain repas sanguin (Vlachou et al., 2006).

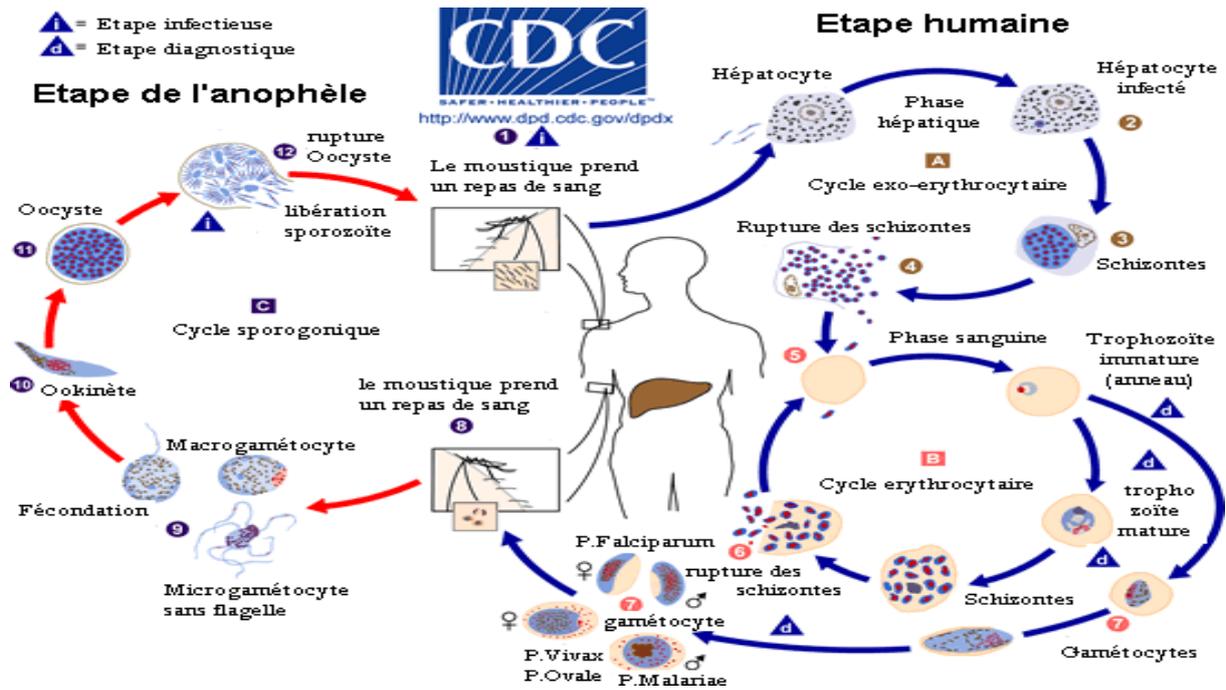


Figure 4 : Cycle biologique du paludisme à *Plasmodium spp* (Source CDC).

5. Diagnostic clinique et biologique du paludisme

5.1. Diagnostic clinique

Le diagnostic clinique repose essentiellement sur les symptômes physiques du patient constatés lors de l'examen. Dans l'infection palustre, les symptomatologies varient en fonction de l'espèce plasmodiale. Une fois que l'homme est infecté, l'interaction hôte parasite peut conduire à des manifestations asymptomatiques aux accès simples voire graves.

5.1.1. *Paludisme simple*

Le paludisme simple se manifeste généralement par une forte fièvre (40°C) avec une peau brûlante et sèche, accompagnée de courbatures, d'asthénie physique, de myalgies et céphalées, d'une sensation de froid avec des frissons incontrôlables, de sueurs, d'un goût fade et parfois de troubles digestifs (anorexie, douleurs abdominales, nausées, vomissements et diarrhée). La fièvre est généralement irrégulière et la température augmente avec des frissons parfois légers (Bartoloni and Zammarchi, 2012). Après quelques jours, l'état fébrile est périodique en fonction du cycle érythrocytaire du parasite qui provoque la destruction des globules rouges parasités toutes les 48 heures (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*), 72 heures (*P. malariae*), ou 24 heures (*P. knowlesi*). En effet, la fièvre est causée par des toxines parasitaires (substances pyrogènes)

I. Généralités

libérées lors de la lyse des globules rouges infectés. De même, la présence de ces toxines dans la circulation sanguine induit une réponse immunitaire qui représente une source de pyrogènes endogènes notamment par la production de médiateurs pro-inflammatoires (Oakley et al., 2011).

5.1.2. *Paludisme grave*

Le développement du paludisme grave dépend du statut immunitaire du sujet infecté. Il est généralement causé par *P. falciparum* en raison de la séquestration des hématies dans les organes profonds. Au cours de l'infection, la physiopathologie diffère en fonction de l'âge, ce qui explique les différences cliniques entre les enfants et les adultes (Hawkes et al., 2013; Newton et al., 1998; Wassmer et al., 2015). Ainsi, les manifestations souvent rapportées sont la détresse respiratoire, l'insuffisance rénale, l'anémie sévère, l'altération de la conscience ou le coma et l'ictère cutané-conjonctival (Bartoloni and Zammarchi, 2012; Imbert, 2003).

5.1.3. *Paludisme gestationnel*

Le paludisme associé à la grossesse repose sur des parasites de *P. falciparum* qui ont une affinité pour le récepteur placentaire chondroïte sulfate A (CSA). L'interaction hôte parasite via CSA permet une accumulation des globules rouges parasités qui gênent la circulation materno-fœtale (Beeson et al., 2002). Ainsi, le paludisme gestationnel est associé à l'anémie maternelle et à l'issue défavorable de la grossesse qui se manifeste par un avortement spontané, la prématurité, le faible poids de naissance du nourrisson et à la morbi-mortalité néonatale (Bardají et al., 2011; Menendez, 1995).

5.2. Diagnostic biologique

Entant donné que le diagnostic clinique reste souvent difficile en raison de la nature non spécifique des signes et symptômes liés au paludisme, le diagnostic biologique constitue un volet important dans la prise en charge correcte des patients.

5.2.1. *Goutte épaisse et frottis sanguin*

La goutte épaisse ainsi que les frottis sanguins minces représentent les méthodes de référence pour le diagnostic biologique du paludisme. Le frottis épais est une technique de concentration qui consiste à examiner environ 2 µl de sang sur une surface moins étendue et colorée au May Grümwald Giemsa pour l'identification du parasite. Cette technique est souvent utilisée en cas

I. Généralités

de faible densité parasitaire pour une meilleure sensibilité. Cependant, sa réalisation reste un peu délicate en raison de la lyse des globules rouges lors de la coloration, ce qui nécessite une expertise pour le lecteur au microscope (Moody, 2002). En ce qui concerne le frottis mince, il est obtenu par étalement d'une goutte de sang sur lame colorée au May Grümwald Giemsa. De ces deux techniques, le frottis sanguin est la méthode largement utilisée en raison de sa simplicité, son intérêt pour identifier l'espèce infectante et l'évaluation de la densité parasitaire (Berry et al., 2009; Durieux, 2018). Toutefois, cette méthode peut également être mise en cause en cas de parasitémie faible.

5.2.2. *Quantitative Buffy Coat (QBC malaria test®)*

Ce test a été mis au point afin d'améliorer l'examen microscopique et simplifier les tests du diagnostic biologique. Il consiste à concentrer le sang du patient dans un tube à hémocrite contenant un anticoagulant ainsi qu'un colorant fluorescent (acridine orange) permettant de colorer l'ADN du parasite. Le tube est ensuite centrifugé pendant 5 minutes à 12 000 g et lu au microscope à épi-fluorescence (Chotivanich et al., 2007). La détection d'un signal fluorescent vert vif dénote la présence de noyaux parasitaires, le cytoplasme apparaissant en jaune-orange. Bien que cette technique soit rapide et simple, elle est limitée en raison de la faible spécificité de la technique (Moody, 2002).

5.2.3. *Test de diagnostic rapide (TDR)*

Le principe de ce test est basé sur la détection d'un antigène parasitaire au stade érythrocytaire et gamétoocyte immature par chromatographie d'une goutte de sang sur une membrane contenant des anticorps spécifiques. Les principaux antigènes recherchés sont l'Histidine-Rich Protein 2 (HRP-2), le lactate déshydrogénase (LDH) et/ou l'aldolase. La plupart des anticorps ciblent les protéines spécifiques de *P. falciparum* notamment HRP2 ou la LDH (Berry et al., 2009). Les TDR ont également montré une efficacité pour le diagnostic des infections à *P. vivax* (Kim et al., 2008). Cependant, les TDR nommés « pan » communs aux 4 *Plasmodium* pp restent moins sensibles pour l'identification des parasites.

5.3. Diagnostic moléculaire

La faible sensibilité ainsi que la non spécificité de la plupart des méthodes conventionnelles ont rendu nécessaire la mise au point de nouvelles techniques afin de poser un diagnostic fiable

I. Généralités

dans la recherche du paludisme pour une meilleure prise en charge. Le développement récent du diagnostic moléculaire a permis une caractérisation plus poussée du parasite.

5.3.1. *Technique de Polymerase chain Reaction (PCR)*

La PCR est basée sur l'amplification exponentielle *in vitro* de l'ADN plasmodial en présence d'amorces spécifiques. Elle a la capacité de détecter le parasite à de très faibles concentrations parasitaires et de spécifier les quatre espèces même en cas d'infection mixte (Looareesuwan et al., 2005; Safeukui et al., 2008). Elle est également utilisée pour vérifier le développement de la pharmaco-résistance d'un médicament (Chotivanich et al., 2007). C'est la technique la plus sensible et la plus spécifique pour la recherche du paludisme. Cependant, de nombreux facteurs limitent l'utilité de cette technique, entre autres la nécessité d'un personnel qualifié pour sa réalisation, un délai de rendu des résultats incompatibles avec un diagnostic d'urgence, et le coût élevé de l'équipement pour une application systématique dans les pays à revenu faible.

5.3.2. *Technique Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)*

C'est la technique de biologie moléculaire alternative mise en œuvre pour pallier aux limites de la PCR. Peu coûteuse et rapide, LAMP permet également l'amplification d'ADN dans les conditions isothermiques. Dans une étude d'évaluation de la méthode associée au séquenceur MinION™, la capacité potentielle de LAMP dans le diagnostic complet du paludisme a été démontrée avec une sensibilité et spécificité similaire à la PCR. En effet, la méthode utilise un ensemble de quatre amorces spécialement conçues qui reconnaissent six séquences distinctes sur l'ADN cible et s'appuie sur une procédure d'auto-cycle dans des conditions isothermiques. Néanmoins, bien que cette méthode soit facile à réaliser avec un rendu rapide des résultats et un coût inférieur à celui de la PCR, il est nécessaire de l'optimiser sur de grands échantillons afin de garantir son efficacité (Imai et al., 2017). Par ailleurs, d'autres techniques notamment la spectroscopie de masse, le dosage par cytométrie en flux et la sérologie sont également utilisées dans le diagnostic biologique. Néanmoins, seules les méthodes traditionnelles (microscopie optique et TDR) sont utilisées en première intention dans les pays en voie de développement malgré les carences liées à ces techniques.

6. Lutttes anti-vectorielles

La lutte anti vectorielle fait partie intégrante des programmes de lutte contre le paludisme. Différentes techniques de lutte ont été recommandées par l'OMS dans les pays endémiques. Au

I. Généralités

premier rang de ces techniques figurent la lutte anti-larvaire, la lutte contre les vecteurs au stade adulte (imagocide) et la réduction du contact homme-vecteur. Ces techniques seront développées succinctement ci-après.

6.1. La lutte anti-larvaire

La lutte anti-larvaire nécessite la connaissance des rapports hôte-vecteur. Son application n'est considérée efficace que si la majorité des gîtes larvaires sont peu nombreux, fixes, localisables et traitables dans une zone par rapport à la communauté à protéger (OMS, 2013). Les principales méthodes de lutte contre les larves comprennent :

✓ La méthode physique

La méthode physique consiste à créer des conditions défavorables à la reproduction des vecteurs, telle que la modification permanente de l'environnement (remblais, drainages, assèchement des zones marécageuses par la plantation d'arbres avides d'eau, destruction des gîtes larvaires) ou sa manipulation temporaire (canaux d'irrigations, modifications de la salinité, éclaircissement de la végétation dans les cours d'eau).

✓ La méthode chimique

Il s'agit de traiter les gîtes larvaires avec des larvicides dans le but de réduire le nombre de larves et de nymphes (OMS, 2013). Cette méthode est complémentaire à la gestion de l'environnement.

✓ La méthode biologique

L'apparition de la résistance aux insecticides a rendu nécessaire la conception de nouveaux outils. A cet effet, un intérêt accru s'est développé pour la mise en œuvre alternative et intégrée de méthodes de lutte anti-vectorielles incluant la lutte biologique. La lutte biologique consiste à introduire dans les habitats aquatiques des prédateurs provoquant un stress pendant le développement aquatique des larves qui vise à atténuer leur capacité de transmission au stade adulte (Abagli et al. 2019; Kamareddine 2012; OMS, 2013).

✓ La méthode génétique

Elle consiste à modifier le patrimoine génétique des moustiques dans le but de produire une progéniture qui ne puisse pas transmettre la maladie (Fuchs et al., 2013; OMS, 2013). Cependant, cette méthode a été mise en cause par certains chercheurs (Wilke and Marrelli, 2015) selon lesquels une souche de moustique transgénique est indispensable pour chaque espèce cible, ce qui rend ces stratégies difficiles à mettre en œuvre pour une lutte efficace dans

I. Généralités

un contexte incluant plusieurs espèces de moustique vectrices du paludisme. Une méthode alternative consiste en la modification du microbiote intestinal des moustiques par l'introduction de bactéries génétiquement modifiées qui limitent la capacité vectorielle des moustiques.

6.2. Lutte contre les vecteurs au stade adulte

La lutte contre les vecteurs au stade adulte est basée sur l'utilisation d'insecticides et reste le principal outil de prévention du paludisme. Pour éradiquer les moustiques dans les zones endémiques, deux méthodes principales sont recommandées par l'OMS (OMS, 2013). Il s'agit de :

✓ La pulvérisation intra domiciliaire à effet rémanent

Elle consiste à appliquer les insecticides sur les surfaces intérieures des habitations pour réduire la capacité vectorielle des vecteurs endophiles (qui se reposent de préférence à l'intérieur des habitations après avoir pris un repas de sang). Les principaux composés synthétiques utilisés appartiennent aux groupes des organochlorés (DDT, dieldrine), des organophosphorés (malathion), des carbamates (bendiocarbe) ou des pyréthriinoïdes (deltaméthrine).

✓ La pulvérisation spatiale

Utilisée en cas d'urgence (épidémie), cette méthode consiste à pulvériser l'extérieur par dispersion d'insecticide dans l'air en vue de détruire les moustiques exophiles.

6.3. Réduction du contact homme-vecteur

La réduction du contact homme-vecteur se fait au moyen des moustiquaires imprégnées (MII) ou à imprégnation durable (MID) qui constituent une mesure efficace dans la réduction générale de l'intensité de la transmission. En outre, il existe des méthodes complémentaires notamment les répulsifs, les vêtements protecteurs et les spirales à diffuseur anti-moustique (OMS, 2013). Malgré les progrès indéniables réalisés grâce à l'utilisation de ces outils essentiels, la résistance des vecteurs aux insecticides rend ces mesures de moins en moins efficaces et a conduit à l'échec des programmes de lutte antivectorielle (Matiya et al., 2019; de Sousa et al., 2019; Iet al., 2013).

7. Lutte antiplasmodiale

La lutte antiplasmodiale repose sur l'utilisation des médicaments à activité inhibitrice de la croissance des parasites. Les antipaludiques peuvent être utilisés dans un but préventif ou curatif. Ces médicaments sont constitués soit de molécules naturelles (quinine, artémisinine), soit de molécules de synthèse dérivées de la quinine et de l'artémisinine. En revanche, le développement de la résistance de *P. falciparum* vis-à-vis des antipaludiques en général et de la chloroquine en particulier, constitue un problème majeur dans le traitement de l'infection. Ainsi, bien que la stratégie actuelle reposant sur l'utilisation des ACT a permis une diminution nette du nombre de cas de paludisme au cours de la dernière décennie, *P. falciparum* s'adapte en permanence et développe des mécanismes de résistance qui menacent l'efficacité de ces combinaisons (Nsanjabana, 2019).

7.1. Les antipaludiques Naturels

Les molécules antipaludiques naturelles ont été isolées à partir des plantes issues de la pharmacopée sud-américaine et chinoise telles que *Cinchona officinalis* et *Artemisia annua* respectivement.

7.1.1. *Quinine*

Isolée à partir d'écorce de quinquina (genre *Cinchona*, Famille des Rubiaceae) en 1820 par Peletier et Cavantou, la quinine est un alcaloïde de la série quinoléique (**Figure 5**). Son mécanisme d'action n'est que partiellement connu. En effet, elle a une action schizonticide en s'accumulant dans la vacuole digestive du parasite inhibant ainsi la détoxification de l'hème, un processus essentiel du parasite (Petersen et al., 2011). Cette molécule est la plus ancienne des antipaludiques et a été largement utilisée dans les formes sévères et non compliquées en raison de son absorption rapide par voie orale ou parentérale (Achan et al., 2011). Son pic plasmatique est atteint entre 2 à 3 heures après administration et sa demi-vie est de 10 à 12 heures (Dorosz, 2015). A ce jour, elle joue un rôle alternatif dans le traitement du paludisme grave dans les cas où l'artésunate, dérivé de l'artémisinine, n'est pas disponible.

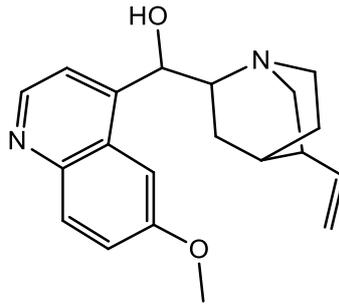


Figure 5 : Structure chimique de la quinine.

Présentations pharmaceutiques

Quinine Lafran® (chlorhydrate de quinine) : comprimés de 250 mg ou 500 mg.

Traitement curatif : adultes et enfants ≥ 30 kg : 8 mg/kg/prise toutes les 8 heures pendant 5 à 7 jours ; adultes ≥ 70 kg : 750 mg/prise toutes les 8 heures pendant 5 à 7 jours.

Quinimax® (quinine + quinidine, cinchonine, cinchonidine) : injectable, ampoules de 125 mg, 250 mg ou 500 mg. Adultes et enfants ≥ 16 kg : 8 mg/kg/perfusion iv toutes les 8 heures (sans dépasser 1500 mg/24 heures chez l'adulte).

7.1.2. Artémisinine

L'artémisinine est un composé isolé à partir de la plante chinoise *Artemisia annua* en 1972, également connu sous le nom de « Qinghao ». Elle appartient au groupe des lactones sesquiterpènes avec un groupement endopéroxyde (**Figure 6**) essentiel pour son activité biologique. La présence du pont endopéroxyde permet à la molécule d'être activée par le fer intra parasitaire ou les groupes hème pour la production des radicaux libres, qui à leur tour, ciblent les groupes nucléotides dans les protéines et lipides nécessaires à la survie du parasite. L'artémisinine et ses dérivés peuvent également agir par alkylation de l'hème (Meshnick, 2002). Les dérivés d'artémisinine sont conseillés en bithérapie avec d'autres médicaments antipaludiques pour limiter le développement de la résistance du parasite.

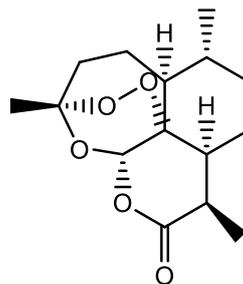


Figure 6 : Structure chimique de l'artémisinine.

Présentations pharmaceutiques : l'artémisinine en tant que molécule pure n'a pas de formulation pharmaceutique. Ce sont ses dérivés, obtenus à partir de processus d'hémisynthèse, qui font l'objet de formulations (voir paragraphe 7.2.3).

7.2. Les antipaludiques de synthèse

Dans le but d'améliorer la production d'antipaludiques et de disposer de quantités suffisantes pour traiter notamment les soldats de la première guerre mondiale, la recherche s'est tournée vers les antipaludiques de synthèse.

7.2.1. *Dérivés de la quinine*

Les 4-aminoquinoléines

✓ La chloroquine : dérivé quinoléique (**Figure 7**), la chloroquine exerce une activité schizonticide sur les formes érythrocytaires des *Plasmodium* en s'accumulant dans la vacuole digestive du parasite, l'empêchant de détoxifier l'hème en hémozoïne (Pussard and Verdier, 1994). Avec une absorption digestive rapide favorisée par la prise d'aliments, la chloroquine a une bonne diffusion tissulaire et une métabolisation hépatique partielle. Elle s'élimine très lentement et sa demi-vie est d'environ 40 à 70 heures (Dorosz, 2015).

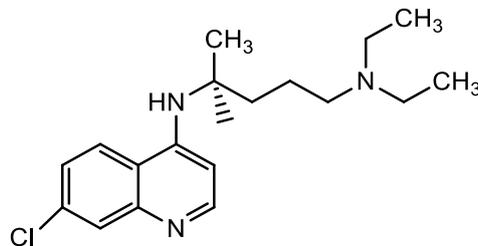


Figure 7 : Structure chimique de la chloroquine.

Présentations pharmaceutiques

Nivaquine® (sulfate de chloroquine) : comprimés sécables de 100 mg ou sirop à 5 mg/ml.

Chimioprophylaxie : adultes et enfants > 50 kg : 100 mg/jour ; < 50 kg : 1,5 mg/kg/jour

Traitement curatif : adultes : 1500 mg sur 3 jours soit 600 mg en une prise plus 300 mg 6 heures plus tard (1^{er} jour), 300 mg/jour en 1 prise pendant les 2 jours suivants. Enfants et nourrissons : 25 mg/kg sur 3 jours soit 10 mg/kg en 1 prise plus 5 mg/kg 6 heures plus tard (1^{er} jour), 5 mg/kg/jour en 1 prise pendant les 2 jours suivants.

I. Généralités

✓ L'amodiaquine : semblable à la chloroquine (**Figure 8**), avec une demi-vie de 3 heures, le mécanisme d'action de l'amodiaquine impliquerait une complexation avec l'hème et une inhibition de la formation d'hémozoïne. Son activité contre certaines souches de *P. falciparum* résistantes à la chloroquine a permis une reprise de son utilisation, dans le cadre d'un traitement associant l'artésunate (Nsanjabana, 2019; Petersen et al., 2011). Cette molécule est utilisée en association avec les dérivés d'artémisinine.

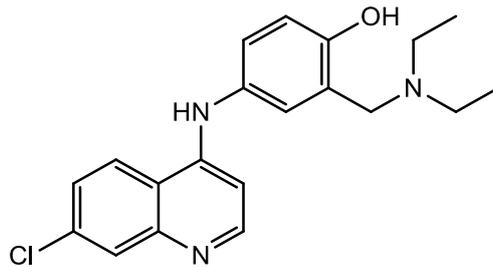


Figure 8 : Structure chimique de l'amodiaquine.

Présentations pharmaceutiques : actuellement, l'amodiaquine n'est plus utilisée en monothérapie et n'est plus disponible en pharmacie.

Les 8-Aminoquinolines

✓ La primaquine (**Figure 9**) : elle a une activité gamétocytocide sur *P. falciparum* et hypnozoïtocide sur *P. vivax* et *P. ovale*. Elle a une bonne absorption digestive et sa demi-vie est très courte. En raison de ses propriétés pro-oxydantes, son utilisation est déconseillée chez des patients souffrants de déficit en glucose-6-phosphatedéshydrogénase pour éviter une hémolyse (Vennerstrom et al., 1999).

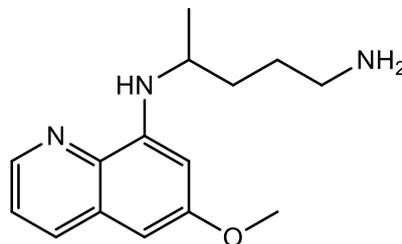


Figure 9 : Structure chimique de la primaquine.

Présentations pharmaceutiques

Primaquine : comprimé de 7,5 ou 15 mg

I. Généralités

Traitement curatif : Enfant ≥ 1 an : 0,25 mg/kg/j. Adulte : 0,25 mg/kg ou 15 mg/j. Traitement de 14 jours à prendre de préférence au cours d'un repas.

Les aryl-amino-alcools

✓ Méfloquine : la méfloquine (**Figure 10**) a été introduite pour le traitement du paludisme résistant à la chloroquine. Elle est souvent utilisée en prophylaxie et a un effet schizonticide. Comme d'autres antipaludiques, la méfloquine a la capacité de se concentrer dans l'hématie parasitée et dans la vacuole nutritive du *Plasmodium* où elle inhibe la digestion de l'hémoglobine (Petersen et al., 2011). Elle a une absorption digestive rapide et une bonne diffusion tissulaire. Sa demi-vie est d'environ 20 jours, permettant une prise hebdomadaire unique en prophylaxie (Dorosz, 2015). Cependant, en raison de la toxicité sur le système nerveux central rapportée chez plusieurs patients, l'usage de la méfloquine en prophylaxie est de nos jours très limité. Elle est souvent utilisée en association avec les dérivés d'artémisinine pour réduire le risque de développement de résistance (Tse et al., 2019).

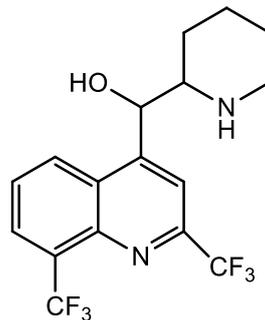


Figure 10 : Structure chimique de la méfloquine.

Présentations pharmaceutiques

Lariam (chlorhydrate de méfloquine) : comprimé sécable de 250 mg.

Chimioprophylaxie : 1 prise hebdomadaire unique en fonction du poids. Adultes et enfants > 45 kg : 1 cp, de 31 à 45 kg : $\frac{3}{4}$ cp, de 20 à 30 kg : $\frac{1}{2}$ cp, de 15 à 19 kg : $\frac{1}{4}$ cp.

✓ Halofantrine : schizonticide majeur, l'halofantrine (**Figure 11**) agit comme la quinine au niveau des membranes cellulaires et est efficace sur les souches résistantes aux autres antipaludiques. Son absorption digestive est variable mais quintuplée par les aliments riches en lipides (prendre en dehors des repas). Son pic plasmatique (comme de son métabolite débutylé) est atteint entre 3 à 6 heures. L'halofantrine a une demi-vie de 1 à 2 jours. Celle de son

I. Généralités

métabolite débutylé est environ de 3 à 5 jours (Doros, 2015). Elle a été utilisée comme un médicament curatif et non pour la prophylaxie en raison des risques de toxicité élevés et de ses propriétés pharmacologiques peu fiables. Son utilisation est conseillée chez les patients exempts de maladie cardiaque et/ou affectés par des formes sévères et résistantes de paludisme (Tse et al., 2019).

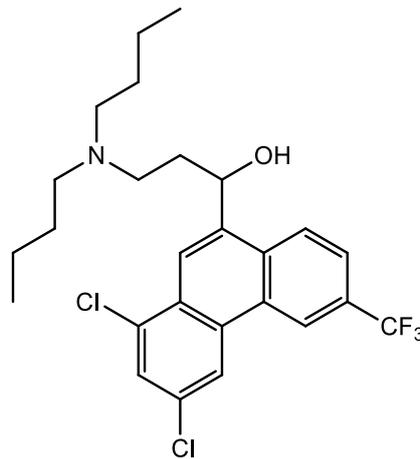


Figure 11 : Structure chimique d'halofantrine.

Présentations pharmaceutiques :

Halfan (chlorhydrate d'halofantrine) : comprimé de 250 mg et suspension buvable à 20 mg/ml (100 mg/5 ml). Traitement curatif : 24 mg/kg en 3 prises espacées de 6 heures en dehors des repas à répéter après 1 semaine.

7.2.2. Les inhibiteurs des acides nucléiques

Les antifolates

La compréhension du rôle de l'acide folique et ses dérivés chez l'homme a permis d'identifier et de développer les antifolates. Les agents antifolates utilisés pour le traitement du paludisme agissent en bloquant les enzymes essentielles à la biosynthèse des acides nucléiques. Ils se divisent en deux groupes : les antifoliniques (proguanil **Figure 12**, pyriméthamine **Figure 13**) et les antifoliques (sulfadoxine **Figure 14**).

✓ Proguanil : C'est un antipaludéen prophylactique qui est souvent pris en association avec d'autres molécules, tels que l'atovaquone pour la prévention du paludisme en zone de résistance à la chloroquine. Dans le foie, le proguanil subit une transformation

I. Généralités

enzymatique en cycloguanil, son métabolite actif. Le cycloguanil agit par inhibition de la dihydrofolate réductase (DHFR) perturbant ainsi la synthèse d'acide folique par le parasite (Dalibon, 2016; Tse et al., 2019). Son pic plasmatique est atteint en 5 heures. La demi-vie d'élimination du proguanil est estimée à 20 heures (Dorosz, 2015).

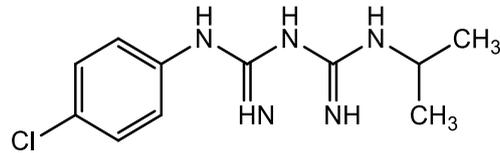


Figure 12 : Structure chimique du proguanil.

Présentations pharmaceutiques

Paludrine (chlorhydrate de proguanil): comprimé sécable de 100 mg. Chimio prophylaxie en 1 prise quotidienne post-prandiale.

Savarine (proguanil+chloroquine). Adultes et enfants > 50 kg : 1cp/ jour ; < 50 kg : CQ 1,5 mg/kg/jour et proguanil 3 mg/kg/jour.

✓ Pyriméthamine et sulfadoxine : une combinaison de pyriméthamine et de sulfadoxine a été approuvée pour le traitement des accès palustres non compliqués à *P. falciparum* depuis 1981. Ces deux principes actifs agissent en inhibant deux enzymes impliquées dans la voie de la biosynthèse du folate; la dihydropteroate synthase (DHPS) et la dihydrofolate réductase (DHFR) (Nsanabana, 2019). Pyriméthamine et sulfadoxine sont rapidement absorbées, avec un pic plasmatique survenant dans les 4 heures suivant l'administration. La demi-vie d'élimination de la sulfadoxine est de 8 jours et celle de la pyriméthamine est au minimum de 4 à 5 jours (Jullien, 2012). A ce jour, la combinaison est encore utilisée en association avec l'artésunate dans certains pays d'Afrique et d'Asie du Sud pour le traitement du paludisme simple.

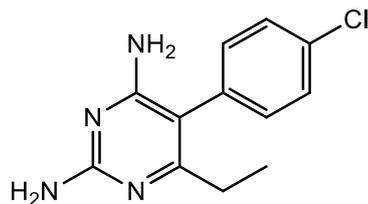


Figure 13 : Structure chimique de la pyriméthamine.

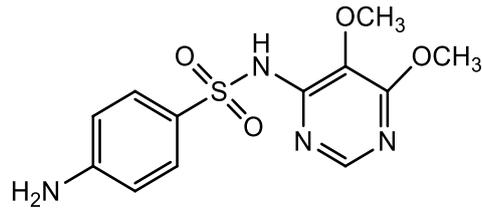


Figure 14 : Structure chimique de la sulfadoxine.

Présentations pharmaceutiques

Fansidar (sulfadoxine-pyriméthamine) : comprimés contenant 500 mg de sulfadoxine et 25 mg de pyriméthamine. Enfant < 12 kg : 1/2 cp écrasé ; 12-20 kg : 1 cp écrasé ; 20-30 kg : 1 cp à 1 cp 1/2 ; 30-50 kg : 1 cp 1/2 à 2 cp. Adulte : 2 à 3 cp une prise unique, ne pas croquer les comprimés.

Les antibiotiques : Tétracycline

✓ Doxycycline : la doxycycline est un antibiotique de la famille des tétracyclines recommandé en prophylaxie dans les zones de multi-résistance ou en association à la méfloquine ou la quinine dans le traitement d'accès simple ou d'accès grave à *P. falciparum*. Elle agit en inhibant les mécanismes de synthèse des protéines dans l'apicoplaste de la mitochondrie provoquant une dérégulation du taux de protéines parasitaires. Elle inhibe également la synthèse des nucléotides et désoxynucléotides (Gaillard et al., 2015).

Présentations pharmaceutiques

Doxypalu (Doxycycline) : Comprimé sécable de 50 mg ou 100 mg. Prophylaxie : Adultes : 100 mg/jour ; enfants > 40 kg : 100 mg/jour ; < 40 kg : 50 mg/jour en une prise unique.

7.2.3. Dérivés de l'artémisinine

Plusieurs groupes de composés semi-synthétiques ont été produits à partir de l'artémisinine afin de prévenir l'apparition de résistance du parasite. L'artémisinine étant peu soluble dans l'eau ou l'huile, son groupe carbonyle a été réduit pour obtenir du dihydroartémisinine (DHA) et ses dérivés (Figure 15), tels que l'artésunate soluble dans l'eau et l'artéméther soluble dans l'huile qui présentent également une activité antipaludique (Cui and Su, 2009). La dihydroartémisinine constitue le même métabolite actif des dérivés d'artémisinine. L'artéméther et l'artésunate sont absorbées par voie orale, un pic plasmatique survenant moins de 1 heure après administration pour l'artésunate et environ 2 heures pour l'artéméther. La demi-vie d'élimination de

I. Généralités

l'artésunate en iv est inférieure à 15 minutes et environ 20 à 72 minutes par voie orale. L'artémether quant à lui s'élimine de moitié entre 2 à 3 heures après administration. En ce qui concerne la dihydroartémisinine, sa demi-vie est comprise entre 30 et 60 minutes après administration iv, et peut atteindre jusqu'à 3 heures par voie orale (Jullien, 2012). Efficaces contre tous les stades parasitaires, les dérivés d'artémisinine agissent rapidement et sont très actifs contre les parasites érythrocytaires. Cependant, du fait de leur faible demi-vie (entre 45 minutes et 3 h), il est intéressant de les combiner avec d'autres médicaments antipaludiques ayant une activité plus prolongée pour former les combinaisons à base d'artémisinine (ACT) (Ouji et al., 2018). Les ACT ont remplacé les quinoléines et les antifolates comme traitement de première intention et contribuent efficacement à la réduction du paludisme dans les continents endémiques notamment en Afrique, et en Asie du Sud-Est. Pour ces combinaisons, les molécules sont choisies sur la base de leurs propriétés pharmacocinétiques, notamment leurs demi-vies plasmatiques beaucoup plus longues que l'artémisinine et leurs mécanismes d'action différents de ceux de l'artémisinine (Ouji et al., 2018). Cinq ACT sont actuellement approuvés: artémether-luméfántrine (Coartem®, Riamet®); artésunate-amodiaquine (Arsucam®, Coarsucam™); artésunate-méfloquine (Artequin®); artésunate-sulfadoxine-pyriméthamine (ASSP) et dihydroartémisinine / pipéraquline (DHA / PPQ) qui constituent les dernières stratégies de lutte contre le paludisme (Ouji et al., 2018; Tse et al., 2019). Les différentes structures sont présentées dans la **figure 15**.

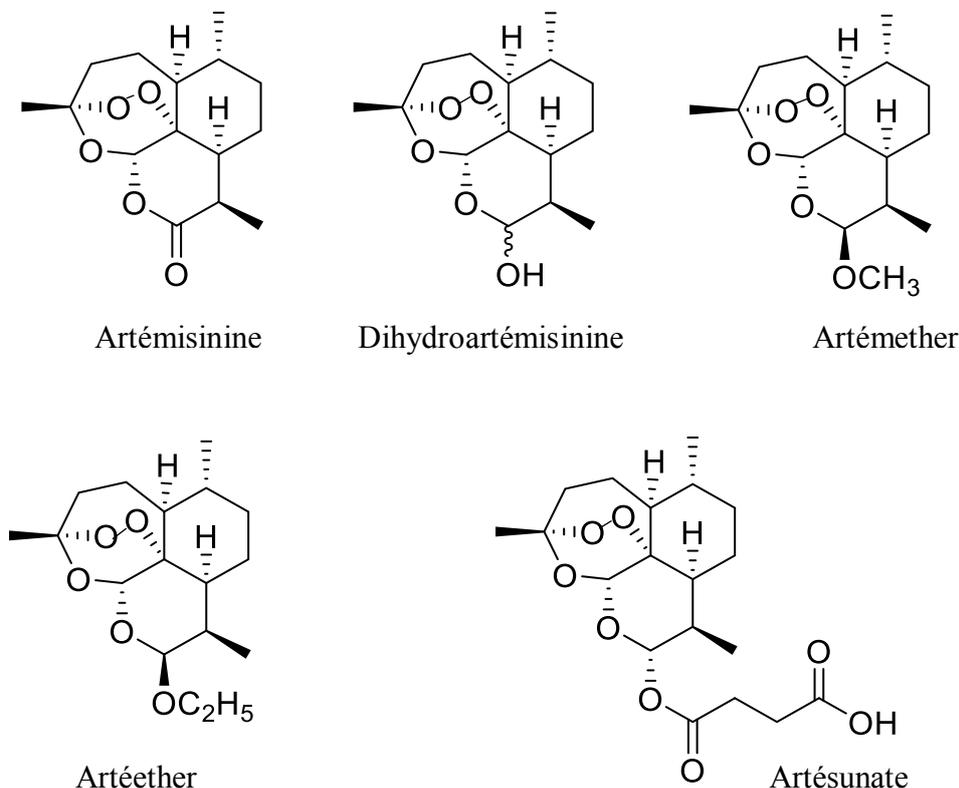


Figure 15 :
Structures
chimiques de
l'artémisinine et
des dérivés.

8. Les différents types de prise en charge

8.1. La prévention pour les voyageurs

Pour les voyageurs non immuns se rendant en zone d'endémie, il est recommandé de prendre un traitement préventif antipaludique avant, pendant et après le voyage. Cinq médicaments sont généralement prescrits, à savoir : la chloroquine, la méfloquine, la doxycycline les associations atovaquone + proguanil, et chloroquine + proguanil. Le choix de ces molécules dépend de la destination (les pays étant classés en 3 groupes selon le niveau de résistance des *Plasmodium* à la chloroquine et à d'autres antipaludiques), la durée et période du séjour, l'intensité de transmission et du profil du voyageur (enfant, poids, femme enceinte, épilepsie, interactions médicamenteuses, allergies, capacités financières du voyageur, ...). La doxycycline est contre indiquée chez les femmes enceintes et enfants de moins de 8 ans. Pour les séjours d'une durée inférieure à sept jours, la prévention repose essentiellement sur la protection contre les piqûres de moustiques (BEH, 2019).

8.2. La prévention des populations vivant en zone d'endémie

Pour les populations vivant en zone d'endémie, la prévention s'adresse aux enfants de moins de 5 ans et aux femmes enceintes sous forme de traitement préventif intermittent (TPI). Le TPI est défini comme l'application d'un protocole thérapeutique complet d'antipaludique sans que le sujet soit infecté (Esu et al., 2019). A cet effet, l'OMS recommande la sulfadoxine-pyriméthamine (SP) en Afrique subsaharienne où la prévalence de la mutation 540 *pf*dhps du parasite *P. falciparum* est inférieure à 50% (OMS, 2011).

Chez les nourrissons, 3 doses de sulfadoxine-pyriméthamine par voie orale sont recommandées pendant la première année de vie lorsque l'enfant est âgé d'environ 10 semaines, 14 semaines et 9 mois, ce qui correspond au calendrier vaccinal systématique du programme élargi de vaccination (PEV). La posologie est adaptée en fonction du poids de l'enfant (OMS, 2011).

Chez les enfants âgés de 3 à 59 mois, 3 doses à 1 mois d'intervalle d'amodiaquine + sulfadoxine-pyriméthamine sont recommandées pendant les saisons de transmission (saison de pluie) afin de prévenir les épisodes de paludisme grave (World Health Organization and Global Malaria Programme, 2015).

Enfin chez les femmes enceintes, l'administration de sulfadoxine-pyriméthamine est vivement recommandée en au moins deux doses, à compter du deuxième trimestre de la grossesse à un intervalle d'au moins 4 semaines. La posologie est de 3 comprimés de sulfadoxine-pyriméthamine (1500 mg/ 75 mg) en prise unique (OMS, 2012).

8.3. Traitement curatif du paludisme non compliqué

Le traitement curatif du paludisme simple causé par *P. falciparum* est basé essentiellement sur l'utilisation d'ACT pendant 3 jours. Ces combinaisons ont révolutionné le traitement du paludisme en particulier celui de *P. falciparum* et ont contribué à la réduction de 60% de décès lié au paludisme (Ouji et al., 2018). A ce jour, cinq combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine sont recommandées par l'OMS, comme évoqué précédemment. Un sixième ACT, l'artésunate/pyronaridine (ASPY) a été récemment approuvé. Cependant, malgré une efficacité remarquable dans les pays d'Asie et d'Afrique, l'ASPY ne répondait pas aux critères d'efficacité de l'OMS (taux d'efficacité thérapeutique supérieur à 90% au jour 42) dans l'Ouest du Cambodge (Leang et al., 2016).

Par ailleurs, dans les zones où la souche *P. vivax* est résistante à la chloroquine, tous les ACT sont efficaces contre l'infection au stade sanguin à l'exception de la combinaison artésunate + sulfadoxine- pyriméthamine (AS+SP) (OMS, 2018b).

8.4. Traitement chez la femme enceinte

La prise en charge du paludisme non compliqué chez la femme enceinte est fonction du stade de la grossesse. Pendant le premier trimestre, l'administration de la quinine à la dose de 10mg/kg toutes les 8 heures pendant 7 jours constitue le traitement de première intention ; à cela, si disponible, s'ajoute la clindamicine à 10mg/kg deux fois par jour pendant 7 jours. Les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine sont recommandées à partir du 2^{ème} et 3^{ème} trimestre de la grossesse.

8.5. Traitement du paludisme grave

Le traitement curatif du paludisme grave impose l'administration d'une molécule parasiticide en intraveineuse dès l'admission du patient pendant au moins 24 heures. Pour toutes les formes de paludisme grave chez l'enfant et l'adulte, c'est l'utilisation d'artésunate (2,4 mg/kg) qui est recommandé en première intention (WHO, 2013). Le traitement iv est administré toutes les 12 puis 24 heures jusqu'à ce que le patient parvienne à avaler les comprimés par voie orale. En cas de rupture de stock d'artésunate, le traitement peut être remplacé par l'artémether (3,2 mg/kg puis 1,6 mg/kg/jour) ou la quinine (20 mg/kg à l'admission puis 10 mg/kg toutes les 8 heures en perfusion intraveineuse).

9. Résistance des parasites aux antipaludiques

La résistance aux antipaludiques constitue un problème majeur pour les campagnes de lutte contre le paludisme dans le monde. La résistance se manifeste par la capacité du parasite à maintenir sa croissance malgré la présence d'un agent inhibiteur (Petersen et al., 2011). Suite à l'utilisation intensive de la chloroquine dans les années 1940, la résistance à ce produit apparaît dès 1960 et se propage rapidement jusqu'à sa diffusion dans toutes les zones d'endémie à partir des années 2000 (Chen, 2014). La résistance à l'artémisinine de son côté, a été signalée pour la première fois en 2006 à l'Ouest du Cambodge pour des cas d'échec thérapeutiques (Dondorp et al., 2009; Fairhurst and Dondorp, 2016).

A ce jour, de nombreuses mutations géniques responsables de la résistance aux médicaments antipaludiques ont été identifiées. Comme son nom l'indique, *P. falciparum* multidrug resistance transporter 1 (*Pfmdr1*) est impliqué dans la résistance de plusieurs antipaludéens. Il a été démontré que l'augmentation du nombre de copie de *Pfmdr1* est associée à la résistance d'un grand nombre de médicaments antipaludiques tels que la quinine, l'halofantrine, la luméfántrine, la méfloquine et l'artémisinine (Sidhu et al., 2006). De plus, la mutation du gène « *P. falciparum* chloroquino-resistance transporter » (*Pfcr1*) permet au parasite de limiter l'accumulation du médicament dans la vacuole digestive, ce qui contribue à la résistance du parasite aux 4-amino-quinoléines, notamment la chloroquine (Sanchez et al., 2007). Certaines mutations de *Pfcr1* sont associées à la baisse de la sensibilité du parasite à l'amodiaquine et à la quinine (Cooper et al., 2002; Tinto et al., 2008). Pour la résistance aux antifolates tels que la pyriméthamine et la sulfadoxine, elle est favorisée par des mutations ponctuelles dans les gènes codant pour la dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (*Pfdhfr*) et la dihydroptéroate synthase (*Pfdhps*), enzymes intervenant dans la synthèse des folates (Gregson and Plowe, 2005; Nsanjabana, 2019). Pour la protéine *Pfnhe-1*, il a été démontré que leur expression était associée à la baisse de la sensibilité des parasites à la quinine (Ferdig et al., 2004).

Concernant les ACT, des cas de résistance à la combinaison artésunate-méfloquine (ASMQ) ont été rapportés en 2008 en Asie du Sud-Est à la frontière entre le Cambodge et la Thaïlande (Wongsrichanalai and Meshnick, 2008). De plus, une étude prospective menée entre 2003 et 2013 a montré que la prévalence croissante des mutations de *pfk13* était le facteur décisif du déclin rapide de l'efficacité de l'ASMQ à la frontière entre la Thaïlande et le Myanmar (Phyo et al., 2016). En outre, la diminution de l'efficacité de l'arthémether-luméfántrine a été également rapportée lors d'une évaluation clinique de deux ACT en Ouganda, avec un risque de parasitémie récurrente d'environ 16% après 42 jours (Kamya et al., 2007). Par conséquent,

I. Généralités

l'émergence des parasites résistants souligne l'urgence de la découverte de nouvelles molécules antipaludiques. La **figure 16** dresse le bilan de la résistance à l'artémisinine dans le monde.

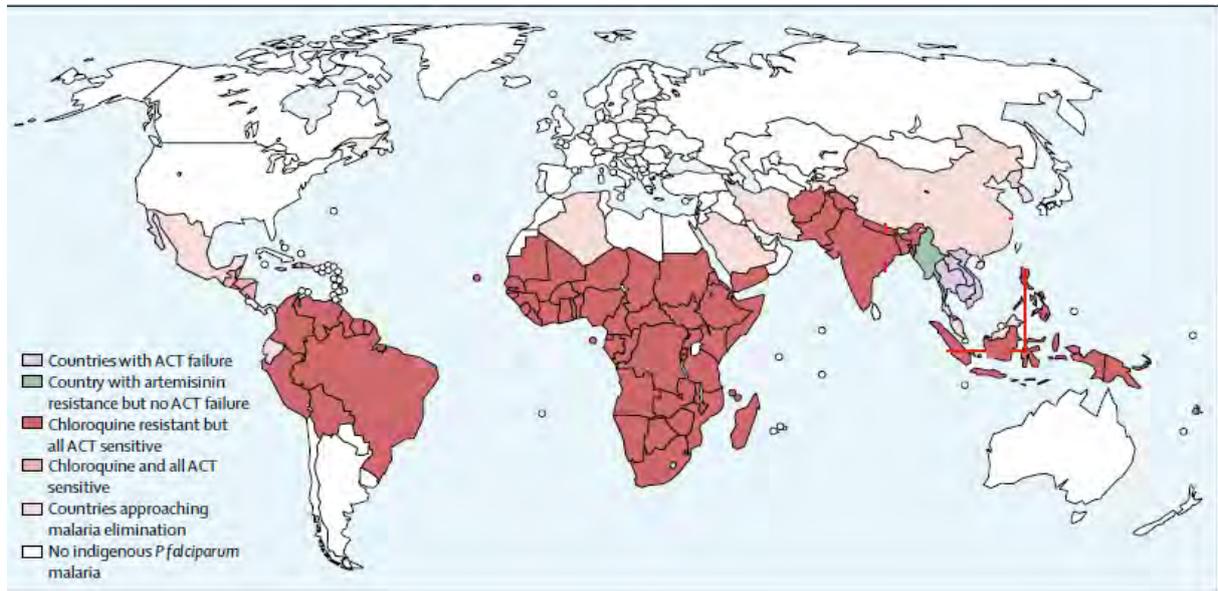


Figure 16 : Répartition mondiale de la résistance du *Plasmodium falciparum* aux médicaments antipaludiques (Ashley et al., 2018).

II. Pathogénèse et immunité anti-palustre

1. Physiopathologie générale du paludisme à *P. falciparum*

Au cours de la phase hépatique, la schizogonie hépatique est asymptomatique, les manifestations cliniques ne sont visibles qu'au cours de la phase érythrocytaire. Le foie est cependant sollicité pour l'activité phagocytaire des cellules de Küpffer, et pour la transformation de l'hémoglobine libérée en bilirubine, d'où une hépatomégalie. Au cours de l'accès simple, la fièvre est due à l'éclatement des schizontes mûrs induisant la rupture des hématies. Le pigment malarique libéré dans la circulation sanguine est pyrogène, provoquant de fortes fièvres. La lyse des hématies conduit progressivement à une anémie. La rate, organe lymphoïde secondaire, rentre en hyperactivité, d'où une splénomégalie. Pendant la phase sanguine de l'accès palustre, les formes âgées du parasite (schizontes) sont « séquestrées » dans les organes profonds (rate, poumons, cœur, cerveau). Cette séquestration repose sur l'expression de protéines parasitaires de la famille « *P. falciparum* erythrocyte membrane protein-1 » (PfEMP1) à la surface des érythrocytes infectés, protéines capables d'interagir avec les récepteurs endothéliaux de l'hôte. Selon la protéine exprimée, les antigènes auront une affinité plus ou moins prononcée pour tel ou tel organe. Dans le cas du neuropaludisme, les protéines exprimées adhèrent préférentiellement aux récepteurs endothéliaux des capillaires cérébraux. Ce mécanisme de séquestration constitue un mécanisme d'échappement à la réponse immunitaire.

2. Pathogénèse du neuropaludisme (ou paludisme cérébral)

La séquestration des globules rouges parasités dans les capillaires cérébraux ainsi que l'activation des cellules endothéliales sont à l'origine des causes déterminantes du paludisme cérébral (Bruneel, 2019; Storm and Craig, 2014; Storm et al., 2019). Les principaux mécanismes pathogéniques impliquent l'hôte et le parasite dans des interactions nombreuses (Acharya et al., 2017).

Au cours de l'infection au stade érythrocytaire, le développement des mérozoïtes est associé à la production de protéines parasitaires qui interagissent avec la membrane érythrocytaire pour former des protubérances à la surface des globules rouges appelées « Knobs » ou « boutons ». Ces boutons contiennent un complexe protéique parasite exprimé aux stades âgés du parasite, dont la protéine PfEMP-1 qui participe au processus de cytoadhérence (Lennartz et al., 2017; Maier et al., 2009). La famille de protéines PfEMP1 est codée par environ 60 gènes *var* codant

II. Pathogénèse et immunité antipalustre

pour 60 protéines PfEMP1 différentes. Une seule protéine est exprimée par cycle parasitaire. Si la protéine exprimée a une affinité spécifique pour les récepteurs endothéliaux du cerveau, les érythrocytes infectés seront localisés préférentiellement dans le cerveau. Les globules rouges infectés sont alors séquestrés dans le système microvasculaire cérébral.

Dans le cerveau, la cytoadhérence est favorisée par les ligands de l'endothélium tels que VCAM-1, ICAM-1, PECAM-1, selectine E et EPCR, exprimés à la surface des cellules endothéliales (Rowe et al., 2009). Un deuxième mécanisme conduit à la formation de rosettes constituées de globules rouges parasités liés à des globules rouges sains. Ce phénomène est caractérisé par l'interaction entre les ligands parasitaires PfEMP-1, STEVOR, RIFIN et les récepteurs des globules rouges non infectés, notamment le récepteur du complément 1 (CR1), l'héparane, la glycophorine C et les antigènes du groupe sanguin ABO (Craig and Scherf, 2001; Rowe et al., 2009). Le ligand PfEMP-1 est capable de se lier aux différents récepteurs tandis que RIFIN à une affinité pour l'antigène A et STEVOR pour le récepteur de la glycophorine C (Nunes-Alves, 2015; Rowe et al., 2009; Yam et al., 2017). En plus d'adhérer aux globules rouges non parasités et aux cellules endothéliales, les érythrocytes infectés peuvent également s'auto-agglutiner autour de plaquettes, via les récepteurs CD36 exprimés à la surface des plaquettes (Pain et al., 2001). L'ensemble de ces événements a pour conséquence l'obstruction mécanique des microvaisseaux et une hypoxie cérébrale (détaillé dans les étapes 1 et 2 de la **figure 17**).

L'activation des cellules endothéliales induite par la séquestration et la libération de molécules parasitaires (étape 3, **Figure 17**) contribue à créer une inflammation locale via la production de médiateurs pro-inflammatoires (TNF, IL1 β , IFN γ) et le recrutement des leucocytes et plaquettes (étape 4, **Figure 17**). Etant donné que ces cellules contribuent également à la production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires (étapes 5 et 6, **Figure 17**), cela peut conduire à une activation exacerbée des cellules endothéliales qui vont produire plus de molécules d'adhésion sur leur membrane favorisant ainsi la séquestration des globules rouges infectés et un déséquilibre de la réponse immunitaire (Deroost et al., 2016; Dunst et al., 2017).

Les lymphocytes T CD8 (LT CD8) participent également à la pathogénèse du paludisme cérébral (Haque et al., 2011). En effet, les LTCD8 activés migrent vers le cerveau et adhèrent à la molécule ICAM-1 de l'endothélium vasculaire *via* LFA-1. A la présentation d'antigènes parasitaires sur les molécules du CMH de classe I par les cellules endothéliales, les LT CD8 sont capables de produire un arsenal cytotoxique, notamment la perforine et le granzyme B, substances impliquées dans l'apoptose des cellules endothéliales et la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (Haque et al., 2011; Howland et al., 2015; Poh and Rénia, 2015; Poh et

al., 2014). Cette ouverture (étape 7, **Figure 17**) favorise la pénétration des monocytes, cytokines, chimiokines et antigènes parasites dans le parenchyme cérébral, entraînant ainsi l'activation des cellules gliales pour aboutir à une neuro-inflammation (Dunst et al., 2017).

La production marquée d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par les phagocytes (macrophages, neutrophiles) pour la destruction des parasites constitue un autre facteur impliqué dans la pathogénèse du neuropaludisme. Parallèlement aux phagocytes, les parasites contribuent également à la production de stress oxydant par la dégradation de l'hémoglobine et la libération d'hème, puissant inducteur de ROS (Percário et al., 2012; Tripathy and Roy, 2015). Le stress oxydant induit par l'hème provoque des lésions au niveau des membranes érythrocytaires par oxydation des lipides insaturés, ce qui compromet la déformabilité des globules rouges et provoque leur rétrécissement. Ainsi, ce phénomène est corrélé à la baisse du flux sanguin dans la microcirculation, à la séquestration accrue des globules rouges parasités et non infectés, qui aboutit par conséquent à une hypoxie (Kavishe et al., 2017; Nuchongsin et al., 2007). En outre, le stress oxydant, en synergie avec le TNF, active l'expression des molécules d'adhésion des cellules endothéliales (Becker et al., 2004).

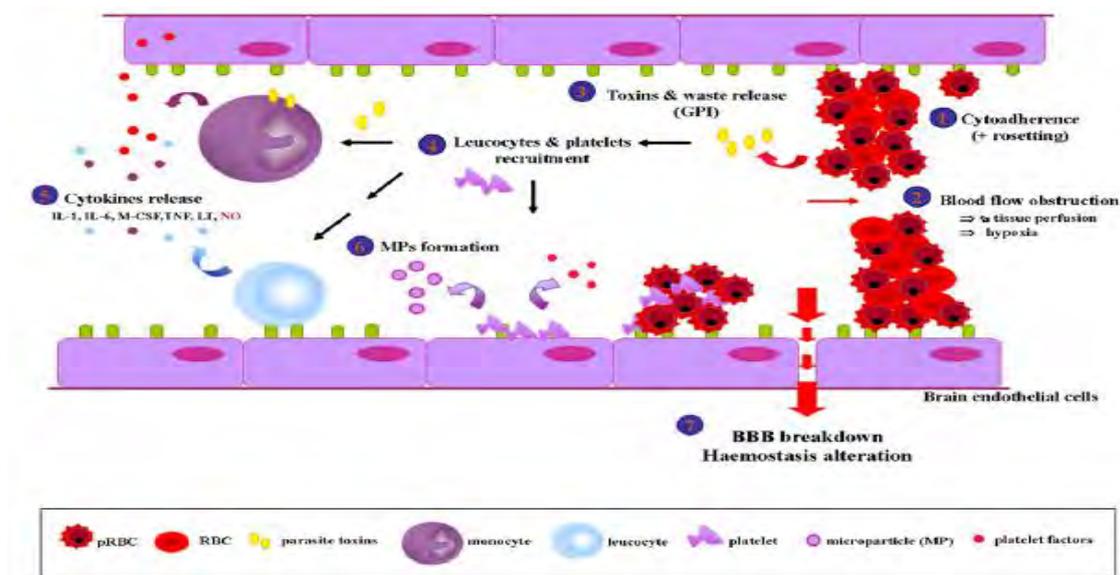


Figure 17 : Mécanismes physiopathologiques du paludisme cérébral adaptés de Gay et al. (Gay et al., 2012).

3. Modèles murins de paludisme

La compréhension de la pathogénie palustre constitue une étape essentielle à la mise au point de stratégies thérapeutiques ou préventives efficaces. A cet effet, les modèles expérimentaux jouent un rôle important, en particulier les modèles murins, plus complets que l'approche *in*

II. Pathogénèse et immunité antipalustre

vitro. Leur manipulation facile permet un examen approfondi des processus pathologiques au niveau des organes vitaux. Bien qu'ils ne reproduisent pas tous les mécanismes cellulaires et moléculaires rencontrés chez l'homme, de nombreuses similitudes avec l'infection humaine permettent de proposer de nouvelles hypothèses (Basir et al., 2012; Ghazanfari et al., 2018). *P. chabaudi*, *vinckei*, *berghei* et *yoelli* sont les quatre espèces murines utilisées en laboratoire chez les rongeurs ; selon l'espèce plasmodiale utilisée et le fond génétique du rongeur, ces infections présentent une biologie et des pathogénicités différentes (Combes et al., 2005; Lou et al., 2001; Stephens et al., 2012). Dans le paragraphe suivant, nous décrirons les modèles d'infection à *P. chabaudi* et *P. berghei ANKA* que nous avons principalement utilisés au cours de nos travaux.

3.1. Modèles de paludisme simple

Dans le modèle murin, différentes souches non létales sont utilisées, notamment *P. chabaudi* (*chabaudi* AS, *P. chabaudi adami*) et *P. yoelii* 17XNL. *P. chabaudi* présente l'avantage d'une similarité avec *P. falciparum* dans sa biologie, notamment l'invasion d'érythrocytes de tout âge (normocytes et réticulocytes), la synchronicité de leurs formes sanguines asexuées et les mécanismes immunitaires développés (Martins et al., 2006; Stephens et al., 2012). *P. chabaudi* est souvent utilisé pour étudier les mécanismes immunitaires mis en place pour le contrôle de l'hyperparasitémie ainsi que pour les vaccins expérimentaux. Cependant, l'infection à *P. chabaudi* est caractérisée par une auto-résolution de la parasitémie au stade sanguin dans les 7 à 14 jours après infection chez les souris sensibles. En effet, au cours de la phase aiguë qui se manifeste par un pic parasitaire, une réponse prédominante de type Th1 est mise en place et permet le contrôle de l'infection ; cette phase est suivie d'une seconde phase chronique au cours de laquelle la réponse Th1 diminue en faveur d'une réponse Th2 qui s'accompagne de la production de cytokines anti-inflammatoires et d'anticorps spécifiques à l'infection (Langhorne, 1989; Namazi and Phillips, 2010).

Le modèle d'infection à *P. chabaudi* a permis de décrypter le rôle des lymphocytes T CD4⁺ dans la production de chimiokines stimulant la migration des cellules effectrices vers la rate pour contrôler la réplication du parasite (Berretta et al., 2019). Fait intéressant, les modèles d'infection à *P. chabaudi* et *P. yoelii* 17XNL non létaux ont permis de démontrer que la surproduction de TNF, due à une hyperparasitémie, affecte les fonctions des cellules dendritiques, notamment leur capacité à produire de l'IL-12 nécessaire au développement d'une immunité protectrice (Wykes et al., 2007). Par ailleurs, les récepteurs du système immunitaire de type Toll (TLR) sont essentiels à la surface des cellules de l'immunité innée pour la

II. Pathogénèse et immunité antipalustre

reconnaissance d'une variété de molécules associées au parasite de *P. falciparum*, comme le glycosylphosphatidylinositol (GPI) et l'hémozoïne provenant des vacuoles digestives (Gowda and Wu, 2018). Cette reconnaissance active les cellules présentatrices d'antigènes, notamment les cellules dendritiques et les monocytes/macrophages, qui produisent alors des cytokines pro-inflammatoires, nécessaires au contrôle et à l'élimination du parasite. Cela a été mis en évidence dans le modèle d'infection à *P. chabaudi* déficientes en TLR9/MyD88 qui ont une baisse significative et délétère de leur réponse inflammatoire (Franklin et al., 2009).

La cytoadhérence et la formation de rosettes sont des phénomènes importants dans l'infection à *P. falciparum* (Rowe et al., 2009). Dans le modèle d'infection à *P. chabaudi*, bien qu'il ne soit pas sévère, on observe un phénomène d'adhésion des globules rouges infectés aux cellules endothéliales hépatiques au stade schizonte par liaison avec les récepteurs tels que ICAM-1 et CD36, accompagné de la formation de rosettes (Cunningham et al., 2017; Stephens et al., 2012). Ces données, bien que non exhaustives, montrent que le modèle expérimental *P. chabaudi* constitue un outil essentiel dans la compréhension de l'immunité et la validation de vaccin et traitements nécessaires à la prise en charge du paludisme.

3.2. Modèles de neuropaludisme

Le paludisme sévère constitue un problème de santé publique et est responsable de 15 à 20% des décès dans le monde (Ghazanfari et al., 2018). Chez l'homme, le paludisme sévère peut revêtir plusieurs formes dont les principales sont la détresse respiratoire, l'anémie sévère et le neuropaludisme. Nous focaliserons ce paragraphe sur les modèles de paludisme cérébral, notamment le modèle d'infection à *P. berghei ANKA* utilisé dans nos travaux. Les souches *P. yoelii* XL et *P. berghei* K173 sont utilisées chez la souris dans le cadre d'études sur le paludisme cérébral murin, malgré des caractéristiques peu semblables avec le neuropaludisme humain, notamment une hyperparasitémie avec *P. yoelii* XL et des signes cliniques dépendants de la charge parasitaire inoculée avec la souche *P. berghei* K173 (de Souza et al., 2010). En revanche, l'infection avec la souche *P. berghei ANKA* reflète de nombreux événements majeurs caractéristiques du paludisme cérébral humain ce qui en fait un modèle largement utilisé (Rénia et al., 2012; de Souza et al., 2010). Il est important de rappeler que le développement de l'infection par *P. berghei ANKA* dépend du fond génétique de la souris. Par exemple chez les souris CBA et C57BL/6, l'infection par *P. berghei ANKA* entraîne un paludisme cérébral mortel ; chez les souris DBA/2, on assiste à un paludisme cérébral non mortel ; et les souris BALB/c ne développent pas de symptômes neurologiques mais meurent d'hyperparasitémie

II. Pathogénèse et immunité antipalustre

(Combes et al., 2005; Lou et al., 2001). De toutes ces souris, les souches CBA et C57BL/6 sont largement utilisées en raison de leur fond génétique les prédisposant à une réponse pro-inflammatoire qui participe au développement de la forme sévère, de même que chez l'homme (Brian de Souza and Riley, 2002). L'infection par *P.berghei ANKA* conduit chez les souris sensibles à la séquestration préférentielle des leucocytes au sein de la microcirculation cérébrale, la production dominante de cytokines pro-inflammatoires, puis à des signes neurologiques après 6 à 8 jours d'infection qui conduisent à une dégradation rapide de l'état général des souris (réduction des fonctions locomotrices, froissement du manteau, coma et mort) (Brian de Souza and Riley, 2002; Lou et al., 2001; Rénia et al., 2012).

Bien que cela ne soit pas aussi significatif que pour l'infection à *P. falciparum*, l'accumulation de globules rouges parasités dans les microvaisseaux cérébraux a été également observée dans l'infection à *P. berghei ANKA* chez des souris jeunes (Basir et al., 2012; Hearn et al., 2000). Dans ce modèle, on assiste à une expansion préférentielle des cellules Th1 qui s'accompagne de la production marquée de médiateurs pro-inflammatoires tels que l'IFN γ , le TNF et l'IL-6 dans le cerveau des souris sensibles (Basir et al., 2012; Hearn et al., 2000; Lou et al., 2001). On observe également une surexpression des molécules d'adhésion, une accumulation de plaquettes et leucocytes, des lésions endothéliales, une perméabilité de la barrière hémato-encéphalique, et une activation des cellules gliales (Barrera et al., 2019; Hearn et al., 2000; Lou et al., 2001; Sarkar et al., 2017). Les cellules gliales constituent les macrophages du système nerveux central et sont activés par des cytokines inflammatoires, des leucocytes et antigènes parasitaires qui traversent le parenchyme cérébral suite à l'altération de la barrière hémato-encéphalique. Cette activation est corrélée à l'inflammation des neurones lors du paludisme cérébral murin (Sarkar et al., 2017). Ces événements sont également rapportés dans le paludisme cérébral humain (Armah et al., 2005; Dorovini-Zis et al., 2011). Une étude récente a fourni des preuves de l'accumulation des cellules T CD8 dans le cerveau au cours du paludisme cérébral humain et murin (Barrera et al., 2019) essentielle à la neurodégénération (Howland et al., 2015). Fait intéressant, il a été démontré que la sensibilité accrue à développer le paludisme cérébral expérimental est liée à l'âge. Comme chez l'homme, les jeunes souris sont plus susceptibles de développer un paludisme cérébral après 6 à 8 jours d'infections que les souris âgées (Hearn et al., 2000).

Bien que le modèle *P. berghei ANKA* ne reproduise pas fidèlement tous les événements de l'infection chez l'homme, il joue un rôle crucial dans la connaissance profonde de la pathologie. La majorité des connaissances disponibles reposent sur les recherches effectuées dans les modèles murins qui permettent des études sur tous les organes.

4. Immunité antipalustre

L'immunité innée constitue la première barrière déployée face au pathogène. Cette défense précoce est non spécifique et repose sur la distinction du soi et du non-soi. Cette réponse contribue à la mise en place d'une réponse spécifique plus tardive, appelée « immunité adaptative ».

Dans les zones où la transmission est pérenne, l'acquisition d'une immunité clinique est précoce (10 à 15 ans) et favorise une protection contre les accès pernecieux (Doolan et al., 2009). Cette protection s'acquiert progressivement et résulte de l'immunité cumulative après exposition à diverses souches présentes dans la zone où vit le sujet conduisant ainsi à un répertoire d'anticorps fonctionnels dirigés contre les antigènes de surface des mérozoïtes et des stades intra-érythrocytaires (Healer et al., 2018). Toutefois, il a été rapporté que le facteur qui détermine l'acquisition d'une immunité protectrice est lié à l'âge plutôt qu'à une exposition répétée aux infections. En effet, une étude a montré que les patients plus âgés (21-35 ans) avec un taux d'hormone élevé, résistaient mieux à l'infection que les plus jeunes (15-20 ans) (Kurtis et al., 2001). Cela suggère que la longue période nécessaire pour atteindre l'immunité protectrice est liée à la maturation du système immunitaire.

4.1. Immunité innée

L'immunité innée fournit une première réponse rapide qui peut permettre de limiter la charge parasitaire en attendant que l'immunité acquise soit fonctionnelle. Elle repose sur des populations cellulaires, notamment les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques qui jouent un rôle fondamental au cours de la phase précoce de la maladie. Ces cellules ont la capacité de détecter des motifs moléculaires conservés associés à des agents pathogènes (PAMP), notamment le glycosylphosphatidylinositol (GPI), l'hémozoïne et les acides nucléiques, grâce à un large éventail de récepteurs présents à leurs surfaces (Gazzinelli et al., 2014). Parmi ces récepteurs, on peut citer les récepteurs de type Toll (TLR) et le récepteur scavenger CD36 (Gowda and Wu, 2018; Gowda et al., 2013; Kawai and Akira, 2011; Thylur et al., 2017). Dans les lignes qui suivent nous parlerons des différents rôles des cellules immunitaires impliquées dans la réponse innée, sans oublier les cellules Natural Killer (NK), les Natural Killer T (NKT) et les lymphocytes T $\gamma\delta$.

4.1.1. *Les monocytes/macrophages*

Polarisation des macrophages

Les monocytes/macrophages sont des cellules clés dans les balances pro- /anti-inflammatoires et pro- /anti-oxydantes. Ainsi, nos travaux sur les propriétés immunomodulatrices de nos extraits de plantes ont porté sur la modulation de l'activation de ces cellules.

Les monocytes font partie de la lignée myéloïde issue de la moelle osseuse, de même que les cellules dendritiques et les neutrophiles. Les monocytes sont circulants et se différencient en macrophages lorsqu'ils pénètrent un tissu. Les fonctions effectrices des macrophages dépendent de leur état d'activation et de leur distribution tissulaire. Ces cellules sont activées ou polarisées en réponse à différents stimuli notamment la reconnaissance d'agents pathogènes ainsi que leur environnement cytokinique. Pour les différencier selon leurs fonctions effectrices, les macrophages ont été classés en deux grands types M1/M2, à l'image de la dichotomie Th1/Th2 (**Tableau 1**).

La polarisation des macrophages vers le phénotype M1 nécessite la présence de cytokines pro-inflammatoires telles que l'interféron- γ (IFN γ), ou le tumor necrosis factor (TNF) et un produit bactérien comme le lipopolysaccharide (LPS). On les appelle macrophages activés par voie classique. Ils sont hautement bactéricides et sécrètent en excès les médiateurs pro-inflammatoires (Mosser and Edwards, 2008). Ainsi, les macrophages M1 produisent davantage d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) via le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase, ce qui renforce leurs fonctions antimicrobiennes et antitumorales. En revanche, cette expression marquée des médiateurs inflammatoires et oxydatifs peut endommager les tissus et prolonger la guérison des plaies (Shapouri-Moghaddam et al., 2018). En ce qui concerne les macrophages M2, ils sont activés par la voie alternative caractérisée par la production de cytokines anti-inflammatoires. Selon le stimulus d'activation reçu, les macrophages M2 peuvent se différencier en 4 sous-ensembles : M2a, M2b, M2c et M2d (Shapouri-Moghaddam et al., 2018). Les macrophages M2a proviennent de la signalisation de l'IL-4 ou de l'IL-13 et expriment les récepteurs du mannose. La différenciation des macrophages M2b est favorisée par la stimulation des complexes immuns et des agonistes des récepteurs TLR ou des ligands des récepteurs de l'IL-1. Cette catégorie de macrophage est caractérisée par la production de cytokines pro- et anti-inflammatoires (IL-10, IL-6, IL-1b et TNF). Cependant, malgré leur capacité à produire des cytokines inflammatoires, les M2b favorisent la différenciation Th2 et la production d'anticorps (**Tableau 1**). Les macrophages M2c quant à eux sont stimulés par l'IL-10 et les hormones glucocorticoïdes et constituent de

II. Pathogénèse et immunité antipalustre

puissants anti-inflammatoires par la production marquée de TGF β et d'IL-10 (Benoit et al., 2008; Mantovani et al., 2004). Les macrophages M2d qui représentent le quatrième sous ensemble des macrophages M2, sont induits par les agonistes des TLR via le récepteur de l'adénosine. Leur différenciation est associée à la suppression des médiateurs pro-inflammatoires en faveur de cytokines anti-inflammatoires et de médiateurs pro-angiogéniques, notamment le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF). Ainsi, contrairement aux macrophages M1, les chimiokines dérivées des macrophages M2 favorisent le recrutement des leucocytes impliqués dans la réparation, le remodelage des tissus, la progression tumorale et l'immunorégulation (Mantovani et al., 2004).

En résumé, les macrophages au cours de leur différenciation, peuvent induire les effets bénéfiques ou néfastes dans une grande variété de maladies auto-immunes et inflammatoires. Tout de même, l'activation des M1 doit être régulée par le phénotype M2 afin de limiter les dommages tissulaires et l'inflammation chronique induits par M1.

Tableau 1 : Caractéristiques biologiques et physiologiques des macrophages M1 et M2 observés chez l'homme et la souris.

Phénotype	Stimuli de différenciation	Marqueurs d'expression cellulaire	Médiateurs produits	Fonctions
M1	IFN γ , TNF, LPS	CD80, CD86, CD68, MHC - II, IL-1R, TLR2, TLR4, iNOS, IL-10 bas, IL-12 haut	TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23, IL-27, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL16, CCL5, Arg-2 (souris), ROS	Réponse Th1 pro-inflammatoire, résistance tumorale
M2a	IL-4, IL-13	Humain : MMR/CD206, IL1Ra; IL-1R II Souris : Arg-1, FIZZ1, Ym1/2	IL-10, TGF- β , CCL17, CCL18, CCL22, CCL24	Réponse anti-inflammatoire, remodelage tissulaire
M2b	Complexes immuns, ligands des TLR, IL-1 β	IL-10 haut, IL-12 bas, CD86	TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, CCL1	Activation Th2, immunorégulation
M2c	IL-10, TGF- β , glucocorticoïdes	Humain : MMR/CD206, TLR1, TLR8 Souris : Arg1	IL-10, TGF- β , CCL16, CCL18, CXCL13	Phagocytose des cellules apoptotiques
M2d	Ligands TLR, ligands des récepteurs d'adénosine	VEGF, IL-12 bas, TNF bas, IL-10 haut	IL-10, VEGF	Angiogenèse, progression tumorale

Implication des monocytes/macrophages dans la réponse antipalustre

La réponse des monocytes/macrophages constitue l'un des premiers événements dans la réponse antipalustre en raison de leur capacité à reconnaître des PAMP. Au début de l'infection, les monocytes activés par les PAMP parasitaires produisent des cytokines pro-inflammatoires

II. Pathogénèse et immunité antipalustre

telles que l'IL-18, l'IL-12 et le TNF entraînant ainsi une cascade d'activation des cellules effectrices et la production d'IFN- γ par les cellules NK et T $\gamma\delta$ pour une meilleure clairance parasitaire (Torre, 2009). De plus, il est connu que la production d'interleukines par les monocytes renforce la capacité antiparasitaire des cellules T $\gamma\delta$ et assure une immunité innée contre le paludisme (Pichyangkul et al., 1997).

En plus de contribuer à l'effet antiparasitaire des cellules effectrices, les monocytes/macrophages participent également au contrôle de la prolifération des parasites par le mécanisme de phagocytose opsonique. Cette phagocytose implique les molécules du complément qui opsonisent le pathogène et les récepteurs de la famille Fc γ R dont les sous-ensembles Fc γ RI et Fc γ RIIa reconnaissent les érythrocytes infectés par les anticorps IgG1 et IgG3 (Chua et al., 2013; Tebo et al., 2002). La phagocytose opsonique des mérozoïtes peut contribuer de façon significative à protéger de l'infection, comme cela a été montré chez des individus prémunis (Osier et al., 2014).

Les monocytes/macrophages participent également à l'élimination des parasites par un autre mécanisme de phagocytose, la phagocytose non opsonique via leur récepteur CD36. Ce mécanisme n'impliquant pas d'anticorps, il joue un rôle important en cas d'infection chez les individus immunologiquement naïfs. Fait intéressant, la phagocytose des érythrocytes non opsonisés *via* CD36 n'induit pas la production de cytokines pro-inflammatoires (McGilvray et al., 2000; Patel et al., 2004; Smith et al., 2003), contrairement à la phagocytose opsonique (Chua et al., 2013). Etant donné que la production de médiateurs pro-inflammatoires est défavorable pour l'issue de l'infection (Penha-Gonçalves, 2019), ce mécanisme d'élimination des parasites fait l'objet de recherches ciblées sur l'identification de molécules permettant d'activer l'expression de CD36 et la phagocytose des érythrocytes infectés (Olagnier et al., 2011).

4.1.2. Cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DC) sont des cellules du système immunitaire reconnues pour leur rôle dans la présentation d'antigènes aux lymphocytes T *via* le CMH. Elles stimulent la réponse immunitaire innée et adaptative en activant d'autres cellules immunitaires grâce à leur capacité à reconnaître les molécules associées aux agents pathogènes (Parmar et al., 2018; Veglia and Gaborilovich, 2017). Les DC sont composées de différentes sous-populations, les DC conventionnelles, les DC plasmacytoïdes (pDC) qui se différencient en DC conventionnelles après activation, et les DC inflammatoires, dont le rôle est fonction des molécules exprimées à leur surface (Götz et al., 2017; Merad et al., 2013).

II. Pathogénèse et immunité antipalustre

Au cours de l'infection palustre, les récepteurs TLR2 et TLR4 détectent de préférence l'ancre glycophospholipidique (GPI) tandis que TLR9 et TLR7, spécifiques aux cellules dendritiques de type pDC, reconnaissent principalement l'ADN du parasite (Merad et al., 2013; Nebl et al., 2005; Wu et al., 2010). Le rôle central des pDC dans l'élimination des parasites a été démontré dans une étude *in vivo*, montrant la capacité de ces cellules à produire de l'IFN de type I de manière précoce (Merad et al., 2013; Spaulding et al., 2016). L'IL-12 produite par les DC constitue également un signal important, impliqué dans l'activation des cellules Natural Killer (NK) pour induire également la production d'IFN γ et favoriser la différenciation des lymphocytes T-helper de type 1 (Th1) nécessaires à la mise en place de la réponse immunitaire adaptative (Bettelli and Kuchroo, 2005; McNab et al., 2015; Walsh and Mills, 2013). En outre, la contribution des DC conventionnelles spléniques a été montrée par leur interaction avec les lymphocytes T CD4 et la phagocytose directe des globules rouges infectés lors d'une infection aiguë (Silva et al., 2015). Par ailleurs, il est important de noter que l'infection palustre inhibe la maturation des DC et compromet leur activité essentielle dans la défense antiparasitaire (Bettiol et al., 2010; Lundie et al., 2010; Ocaña-Morgner et al., 2003).

Bien qu'ayant un rôle important dans l'activation et le contrôle de l'immunité adaptative, les DC peuvent également induire une immunopathologie qui conduit au développement du paludisme cérébral (deWalick et al., 2007; Piva et al., 2012). En effet, il a été démontré que l'appauvrissement des DC conventionnelles chez les souris infectées par *P. berghei ANKA* empêche l'activation précoce des cellules TCD4 et par conséquent, atténue l'inflammation cérébrale et la mortalité due au paludisme cérébral expérimental (deWalick et al., 2007). Ainsi, les sous-ensembles CD8 α^+ et CD103 $^+$ des cellules dendritiques favorisent l'immunopathologie cérébrale dépendante des LT CD8 au cours de l'infection à *P. berghei ANKA* (Guermontprez et al., 2013).

4.1.3. Cellules Natural Killers (NK)

Les cellules NK contribuent au contrôle de l'infection palustre en raison de leur capacité à produire très rapidement de l'IFN γ qui entraîne une lyse des globules rouges infectés chez les patients prémunis (Arora et al., 2018; Horowitz et al., 2010; Nielsen et al., 2016). Il a été démontré *in vitro* leur capacité à répondre à l'infection en moins de 6 heures par l'expression de CD25 et la production d'IFN γ , avec un maximum de production à 24 heures (Artavanis-Tsakonas and Riley, 2002; Nielsen et al., 2016). Cette capacité à produire de l'IFN γ est dépendante de certaines cytokines exogènes telles que l'IL-2, l'IL-18, l'IL-15 et l'IL-12

II. Pathogénèse et immunité antipalustre

produites par les cellules dendritiques, les cellules T ou les macrophages (Baratin et al., 2007; Ghofrani et al., 2019; Horowitz et al., 2010; McCall et al., 2010; Nielsen et al., 2016). En outre, la diminution du nombre de cellules NK chez des souris infectées par *P. chabaudi* a été associée à une hyperparasitémie et à une altération de la maturation des cellules dendritiques (Ing and Stevenson, 2009). De plus, il a été démontré que les érythrocytes infectés induisaient plus efficacement l'activation des cellules NK et la production de cytokines que les schizontes lysés; cela suggère que les cellules NK interfèrent directement avec les globules rouges infectés (Artavanis-Tsakonas and Riley, 2002; Doodoo et al., 2002). Or, il a été récemment démontré que les cellules NK peuvent également participer au contrôle de l'infection par le mécanisme de cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) (Arora et al., 2018; Hart et al., 2019).

4.1.4. Cellules Natural Killer T (NKT)

Les cellules NKT sont des cellules immunitaires innées qui possèdent à la fois des marqueurs de lymphocytes T et de lymphocytes NK. La contribution des cellules NKT dans la défense antiparasitaire a été montrée pendant les phases hépatique et sanguine. En effet, l'administration d' α -galactosylcéramide (ligand glycolipidique spécifique des NKT) chez des souris infectées par *P. yoelli* ou *P. berghei* a provoqué une inhibition de la croissance parasitaire et favorisé l'augmentation du nombre de lymphocytes T CD8 et CD4 impliqués dans l'immunité protectrice au stade hépatique (Gonzalez-Aseguinolaza et al., 2002). De même, il a été démontré que la présence de cellules NKT bloque le développement du paludisme cérébral chez des souris BALB/c en modulant la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules TCD4 au profit d'une réponse de type Th2 (Hansen et al., 2003). Il a enfin été montré que les cellules NKT, en induisant la réponse T auxiliaire de type 2 (Th2), contribuent à la formation d'anticorps anti-MSP-1 spécifiques des antigènes ancrés au GPI (Hansen et al., 2003).

4.1.5. Lymphocytes $T\gamma\delta$

Les lymphocytes $T\gamma\delta$ sont des cellules T non conventionnelles présentant à leur surface le récepteur TCR γ/δ qui permet de reconnaître les antigènes sans passer par le CMH. Parmi les cellules $T\gamma\delta$, le sous-groupe V γ 9V δ 2 ou cellules TV δ 2⁺ qui semble être plus abondant dans le sang périphérique, contribue à un contrôle de l'infection au stade érythrocytaire. En effet, ce groupe est impliqué dans la reconnaissance précoce des phosphoantigènes provenant des schizontes et la production de cytokines pro-inflammatoires néfastes au parasite (Dantzler and

II. Pathogénèse et immunité antipalustre

Jagannathan, 2018). Une étude récente a montré que le taux de cellules $TV\delta 2^+$ chez les enfants de moins de 5 ans est beaucoup plus élevé qu'à l'âge adulte et diminue progressivement en cas d'infections palustres répétées. La production des cytokines $INF\gamma$ et TNF par ces cellules était associée à une probabilité plus élevée d'obtenir des infections submicroscopiques chez ces enfants, suggérant un rôle non négligeable dans le contrôle de la multiplication parasitaire (Jagannathan et al., 2017).

Par ailleurs, chez les individus prémunis atteint de paludisme simple et ne possédant pas de cellules $TV\delta 2^+$, un sous ensemble de cellules $T\gamma\delta$ productrices d'IL-10 se développe pour le contrôle de l'infection (Taniguchi et al., 2017). Ces cellules peuvent également jouer un rôle alternatif en tant que cellules présentatrices d'antigènes aux lymphocytes $TCD4^+$ et $CD8^+$ et activer l'immunité adaptative (Howard et al., 2017).

4.2. Immunité adaptative

L'immunité adaptative est caractérisée par une réponse spécifique vis-à-vis d'un antigène grâce à une mémoire immunologique mise en place suite à la première rencontre de l'antigène. Elle est régulée par les lymphocytes T et B à médiations cellulaire et humorale respectivement. Les lymphocytes B produisent des anticorps spécifiques qui circulent dans le sang et sont prêts à fixer l'antigène déjà mémorisé. L'immunité à médiation cellulaire quant à elle est régulée par les cellules du système immunitaire inné telles que les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques et les cellules NK, toutes capables de présenter les antigènes *via* le CMH aux lymphocytes T et de produire des cytokines qui vont permettre d'activer ce processus. Dans la suite de ce paragraphe, nous présenterons ces deux aspects du système immunitaire adaptatif afin de mettre en exergue leurs contributions dans la protection contre le paludisme.

4.2.1. *Immunité à médiation cellulaire*

Rôle des lymphocytes T CD4

Les lymphocytes T CD4 sont stimulés par les antigènes parasitaires peptidiques présentés sur les molécules du CMH de classe II qui sont exprimées par les cellules présentatrices d'antigènes. Des signaux de costimulation provenant des interactions entre molécules de surface des cellules présentatrices d'antigènes et les lymphocytes T favorisent l'activation des cellules CD4 et permettent leur prolifération et leur différenciation en des sous-ensembles fonctionnellement distincts (DuPage and Bluestone, 2016; Wykes and Lewin, 2018) dont nous parlerons brièvement. La différenciation des lymphocytes T CD4 est également régulée par les

II. Pathogénèse et immunité antipalustre

cytokines produites par les cellules présentatrices d'antigènes. Les lymphocytes T CD4 jouent un rôle majeur dans le contrôle de l'infection palustre (Roestenberg et al., 2009; Seder et al., 2013). Les lymphocytes CD4 de type Th1 orientent la réponse immunitaire vers la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF, l'IFN γ , l'IL-12, et l'IL-2 (Farrington et al., 2017; Torre et al., 2002). Au cours d'une infection palustre, la production d'IFN γ est associée à la protection. En effet, la présence de lymphocytes Th1 spécifiques de la protéine parasitaire circumsporozoïte (CSP) et producteurs d'IFN γ favorise la diminution de la charge parasitaire et empêche le développement de la forme grave du paludisme (Reece et al., 2004). Par ailleurs, l'activation précoce des cellules NK à produire une quantité suffisante d'IFN γ en réponse aux érythrocytes infectés nécessite la sécrétion d'IL-2 par les cellules T CD4 (Horowitz et al., 2010). Toutefois, bien que l'INF- γ soit essentiel au contrôle de l'infection palustre (King et Lamb 2015; Ing et Stevenson 2009), sa sécrétion par les lymphocytes CD4 Th1 a été également associée à l'issue défavorable de la maladie. Il a été rapporté qu'un excès d'IFN γ pourrait contribuer à l'altération de l'immunité humorale spécifique au parasite pour aboutir à des formes graves (Fernandes et al., 2008; Zander et al., 2015). De manière similaire, des souris infectées par *P. berghei ANKA* et déficientes pour le facteur de transcription nécessaire à la différenciation des cellules Th1 n'ont pas développé un neuropaludisme malgré une hyperparasitémie. Ce résultat a été associé à la baisse du nombre de cellules T CD4 productrices d'IFN γ et à une réponse de type Th2 (Oakley et al., 2013).

Contrairement aux cellules Th1, l'activation des lymphocytes Th2 oriente la réponse immunitaire vers la production de cytokines anti-inflammatoires et favorise la mise en place de l'immunité à médiation humorale (Walker and McKenzie, 2018; von der Weid et al., 1994). Troye-Blomberg et al. corroborent cette affirmation dans leur étude qui indique que l'activation de cellules T productrices d'IL-4 était associée à une production accrue d'anticorps anti-Pf155/RESA chez des individus exposés (Troye-Blomberg et al., 1990).

Les cellules T follicular helper (Tfh), un sous-ensemble des lymphocytes T CD4 ont été également associées au contrôle du paludisme. Ces cellules sécrètent de l'IL-21 et jouent un rôle important dans l'activation des lymphocytes B et la production d'anticorps spécifiques pendant l'infection (Figueiredo et al., 2017). De même, il a été montré que les lymphocytes Tfh sont capables de maintenir le contrôle de la parasitémie pendant la phase chronique et d'assurer une immunité protectrice dans l'infection à *P. chabaudi* et *P. yoelii* (Pérez-Mazliah et al., 2015).

Enfin, les lymphocytes Th17 qui se différencient en présence de « transforming growth factor β » (TGF β), d'IL-6 et d'IL-13, produisent de l'IL-17 impliqué dans les maladies inflammatoires

II. Pathogénèse et immunité antipalustre

et auto-immunes (Keswani et al., 2016; Sandquist and Kolls, 2018). Dans une étude effectuée chez les sujets infectés par *P. vivax*, il a été montré *in vitro* une augmentation significative du nombre de cellules Th17 associée à un profil inflammatoire. Cependant, aucune corrélation n'a été établie entre le niveau de cellules Th17 et la parasitémie (Bueno et al., 2012). De plus, l'activation des cellules Th17 observée lors d'une infection à *Plasmodium berghei ANKA* ne contribuait ni à la réduction de la charge parasitaire au stade sanguin (Ishida et al., 2010), ni à la protection contre l'infection à *P. chabaudi* au stade hépatique (Mastelic et al., 2012). Le rôle des cellules Th17 dans le paludisme doit être encore étudié pour mieux comprendre son implication dans la protection palustre.

Rôle des lymphocytes T CD8

Les lymphocytes T CD8 sont activés lors de la reconnaissance des antigènes présentés par les molécules du CMH de classe I sur les cellules présentatrice d'antigène. Cette activation conduit à leur prolifération puis à leur différenciation en cellules T cytotoxiques capables de détruire les érythrocytes infectés. Les voies effectrices utilisées par les cellules T CD8 pour éliminer *Plasmodium* reposent sur la production d'IFN γ , de TNF pour l'immunité protectrice, et de granzyme B et perforine pour les réponses cytotoxiques (Butler et al., 2010; Imai et al., 2010). Au stade hépatique, il est connu que la fonction effectrice des lymphocytes T CD8 spécifiques de la protéine CSP, permettant d'inhiber la croissance parasitaire, est détectée au bout de 24 heures. Ainsi, quelques jours après, ces lymphocytes T CD8 antiparasitaires sont stables et se différencient en cellules T mémoires pour une meilleure protection immunitaire contre le paludisme (Morrot and Zavala, 2004). En outre, l'IFN γ , sécrété par les cellules T CD8, stimule les hépatocytes pour la production d'oxyde nitrique toxique pour le parasite (Butler et al., 2010; Nganou-Makamdop et al., 2012; Seguin et al., 1994).

En revanche, peu d'études rapportent le rôle des LT CD8 au stade sanguin. Bien que quelques travaux indiquent une activation des LT CD8 au stade érythrocytaire (Chandele et al., 2011; Müller et al., 2017), il a été démontré que le transfert des cellules T CD8 de souris immunisées à des souris immunodéficientes et infectées par *P. yoelii* n'a pas permis de protéger les souris. Cependant, les auteurs démontrent une action indirecte des LT CD8 qui activent les monocytes *via* la sécrétion d'IFN γ (Imai et al., 2010).

Par ailleurs, bien que les cellules T CD8 jouent un rôle dans la protection immunitaire au stade sanguin *via* les cellules phagocytaires, elles semblent être associées au développement du paludisme cérébral murin pour deux raisons: la production de perforine et granzyme B impliqués dans la dysfonction de la barrière hémato-encéphalique due à la destruction des

II. Pathogénèse et immunité antipalustre

cellules endothéliales, et la production concomitante d'IFN γ qui active l'expression des molécules d'adhésion par les cellules endothéliales favorisant la séquestration des globules rouges parasités dans les microvaisseaux cérébraux (Claser et al., 2011; Haque et al., 2011; Howland et al., 2015).

En somme, les réponses immunitaires à médiation cellulaire participent à la défense antipalustre aux stades pré-érythrocytaire et érythrocytaire. Dans les lignes qui suivent nous détaillerons la contribution des cytokines à cette défense.

Rôle des cytokines dans le paludisme

✓ Le TNF

Le facteur de nécrose tumorale α (TNF) est une cytokine pro-inflammatoire de type Th1 sécrétée par différentes cellules immunitaires qui peut avoir un effet bénéfique ou pathologique au cours du paludisme. Une expérience effectuée sur les hépatocytes humains et murins a montré *in vitro* la capacité du TNF à stimuler les cellules du foie à produire un médiateur soluble pouvant inhiber le développement du parasite au stade précoce de la maladie (Depinay et al., 2011). Pour le stade érythrocytaire, il a été montré que les souris déficientes en TNF développent un paludisme cérébral léthal après une infection à *P. chabaudi* (Hernandez-Valladares et al., 2006).

En plus de ces effets bénéfiques, le TNF est largement décrit dans la pathogénèse du paludisme cérébral. Chez des enfants gambiens atteints de paludisme à *P. falciparum*, une concentration élevée de TNF plasmatique était associée à une hyperparasitémie, une hyperthermie, à la survenue d'un paludisme cérébral et au décès (Kwiatkowski, 1990). De plus, dans une étude récente, il a été rapporté que le taux élevé de TNF dans le liquide céphalorachidien chez des enfants ougandais atteints de paludisme cérébral était associé à un coma prolongé, un déficit neurologique et une atteinte cognitive prolongée (Shabani et al., 2017). En outre, le TNF contribue à l'expression de la molécule d'adhésion ICAM-1 sur les cellules endothéliales, essentielle pour la séquestration des globules rouges infectés dans les organes profonds (Che et al., 2000; Lou et al., 2001; Storm and Craig, 2014). Ainsi, dans un contexte de paludisme cérébral, le TNF pourrait constituer une cible intéressante dans le traitement de cette pathologie.

II. Pathogénèse et immunité antipalustre

✓ L'IFN γ

L'IFN γ constitue également une cytokine Th1 dont l'effet antiparasitaire est démontré. Comme indiqué précédemment, la sécrétion d'IFN γ est assurée par diverses populations cellulaires au cours de l'infection, notamment les cellules NK et les cellules T. L'IFN γ est essentiel à l'activation optimale des cellules B et des monocytes qui jouent un rôle important dans le contrôle de l'infection à *P. falciparum* (Horowitz et al., 2010; King and Lamb, 2015; McCall and Sauerwein, 2010). La baisse de la sécrétion d'IFN γ par les cellules NK dans le modèle expérimental murin a été associée à une hyperparasitémie (Mohan et al., 1997). De plus, Mitchell et al. suggèrent que la production précoce d'IFN γ est essentielle pour induire une protection contre le paludisme cérébral expérimental et qu'un taux trop faible d'IFN γ conduit au développement du paludisme cérébral (Mitchell et al., 2005). En accord avec ces études, l'absence d'IFN γ chez des souris infectées par *P. chabaudi* a conduit à une hyperparasitémie et à une mortalité significative par rapport au souris sauvages (Su and Stevenson, 2000).

Cependant, l'IFN γ contribue également, de même que le TNF, à la pathogénèse palustre et notamment à la séquestration des parasites dans les organes vitaux (Lou et al., 2001). La production excessive d'IFN γ participe à l'accumulation des érythrocytes parasités dans le cerveau (Claser et al., 2011), à la surexpression des molécules d'adhésion (Lou et al., 2001), à l'activation des cellules endothéliales (Villegas-Mendez et al., 2017), et au recrutement des lymphocytes T CD8 (Gun et al., 2018; Villegas-Mendez et al., 2012), tous ces facteurs contribuant au paludisme cérébral.

✓ L'IL-12

L'IL-12, produite essentiellement par les cellules dendritiques (McNab et al., 2015), a la capacité d'induire une réponse précoce à l'infection palustre en favorisant la production d'autres cytokines antiparasitaires (Crutcher et al., 1995). Chez des souris infectées par *P. chabaudi*, il a été montré que l'IL-12 induisait la production d'IFN γ , de TNF et d'oxyde nitrique (Stevenson et al., 1995). En outre, un faible taux plasmatique d'IL-12 a été associé chez des enfants au développement de complications palustre (Malaguarnera et al., 2002). Dans une étude menée chez la souris, le rôle de l'IL-12 dans l'activation de l'érythropoïèse permettait de réduire l'anémie palustre (Mohan and Stevenson, 1998). Ces résultats suggèrent l'implication de l'IL-12 dans le contrôle de l'infection au stade sanguin.

Toutefois, comme les autres cytokines pro-inflammatoires, l'IL-12 participe au développement du paludisme cérébral (Schmidt et al., 2011). Chez la souris infectée par *P. berghei ANKA*, l'inhibition de la production de médiateurs pro-inflammatoires dont l'IL-12 a permis de

II. Pathogénèse et immunité antipalustre

protéger les souris contre le paludisme cérébral et une mortalité prématurée (Rodriguez et al., 2018; Shryock et al., 2013).

En conclusion, il faut retenir que la production de ces cytokines inflammatoires est nécessaire pour un contrôle précoce de l'infection ; cependant, une production excessive est corrélée au développement de formes grave du paludisme.

✓ IL-10 et TGF β

L'IL-10 et le TGF β sont deux cytokines anti-inflammatoires impliquées dans la balance pro- et anti-inflammatoire. Comme cela a été exposé précédemment, une réponse Th1 pro-inflammatoire excessive est délétère pour l'hôte et nécessite un rééquilibrage permettant de limiter les dommages. A cet effet, de nombreuses études ont mis en évidence la contribution des cytokines anti-inflammatoires IL-10 et TGF β pour réguler l'inflammation lors de l'infection palustre (Li et al., 2003). L'IL-10 est connue pour son activité protectrice de l'immunopathologie générée par l'infection en inhibant les médiateurs pro-inflammatoires, bien que modulant négativement la clairance parasitaire (Couper et al., 2008). Dans le modèle à *P. berghei ANKA*, un taux réduit d'IL-10 dans les organes tels que la rate et le cerveau a été corrélé au développement du paludisme sévère. Dans cette même étude, il a été démontré que l'IL-10 inhibe l'expression d'ICAM-1 sur les cellules endothéliales conduisant ainsi à la protection contre le paludisme cérébral (Kossodo et al., 1997). En accord avec cette étude, les souris déficientes en IL-10 présentent une accumulation accrue de parasites dans le cerveau, associée à un œdème et à une hémorragie cérébrale (Sanni et al., 2004).

En ce qui concerne le TGF β , dans le modèle d'infection de souris BALB/c, il favorise l'inflammation au début de l'infection pour une meilleure clairance parasitaire et réduit ensuite l'inflammation en maintenant l'équilibre plus tard dans l'infection (Omer and Riley, 1998). Ainsi, la présence de TGF β dans le plasma de souris déficientes en IL-10 a permis de réduire la réponse inflammatoire et de limiter la virulence de *P. chabaudi* (Li et al., 2003). Dans une étude évaluant l'équilibre entre cytokines pro- et anti-inflammatoires au cours de l'infection à *P. berghei ANKA*, il a été prouvé que l'inhibition de la production du TGF β au cours de l'infection était associée à une inflammation sévère et une activation accrue des cellules gliales, impliquée dans la neuroinflammation, contrairement aux souris déficientes en IL-6 (Sarkar et al., 2017). Ce résultat met en évidence la nécessité d'une balance équilibrée entre les deux groupes de cytokines pour une évolution favorable de l'infection palustre.

II. Pathogénèse et immunité antipalustre

4.2.2. Immunité à médiation humorale

L'immunité adaptative à médiation humorale est régulée par les cellules B mémoires activées par des signaux provenant des cellules T folliculaires (Tfh) (Figueiredo et al., 2017). Les cellules B mémoires produisent essentiellement des anticorps des types IgM et IgG en réponse aux antigènes parasitaires déjà rencontrés. Les principaux antigènes immunogènes de mérozoïtes sont AMA-1, MSP-1, MSP-2, et PfRH, impliqués dans l'invasion des érythrocytes ; l'antigène PfEMP1 est exprimé au stade trophozoïte intra-érythrocytaire et est impliqué dans la cytoadhérence des globules rouges infectés. Au stade mérozoïte ; les anticorps empêchent leur invasion dans les érythrocytes et favorisent leur élimination par les cellules phagocytaires via les récepteurs Fc ou du complément. Les anticorps dirigés contre PfEMP1 bloquent la séquestration des parasites dans les microvaisseaux et empêchent la rupture des érythrocytes et la sortie des parasites (Teo et al., 2016).

L'acquisition de l'immunité à médiation humorale se fait de façon progressive chez les individus vivant en zone endémique par exposition répétée à l'infection. La diversité des infections permet à l'individu d'obtenir un répertoire d'anticorps assez varié pour reconnaître le panel d'antigènes rencontrés dans une zone donnée (Doolan et al., 2009). Cette immunité acquise semble stable, même dans les zones de faible transmission. En effet, il a été rapporté dans une zone de faible transmission que près de la moitié des adultes développaient des anticorps spécifiques et stables suite à une infection (Wipasa et al., 2010). Ces résultats suggèrent que la prémunition peut être conservée même après un nombre limité d'infections.

Par ailleurs, les anticorps cytophiles des sous-classes IgG1 et IgG3 sont essentiels dans la protection palustre, en raison de leur affinité pour les récepteurs Fc γ RIIIa impliqués dans la phagocytose opsonique des globules rouges (Aucan et al., 2001; Kwenti et al., 2019; Tebo et al., 2002). Au Cameroun, il a été montré chez des enfants de 2 à 15 ans que le taux d'IgG1 et IgG3 anti-MSP-1 est corrélé à l'âge (Kwenti et al., 2019). Ces résultats vont dans le sens d'Anchang-Kimbi et al. qui rapportent également une prédominance d'IgG1 et IgG3 spécifiques à *P. falciparum* chez les femmes enceintes (Anchang-Kimbi et al., 2016). Les anticorps cytophiles ont la capacité de favoriser la phagocytose opsonique des parasites en coopération avec les cellules phagocytaires qui produisent alors des cytokines pro-inflammatoires et régulent la production d'oxyde nitrique contribuant ainsi à la destruction du parasite (Osier et al., 2014; Tebo et al., 2002). Parallèlement, les anticorps non cytophiles, principalement les IgG4, inhibent les effets protecteurs des anticorps cytophiles, et sont associés à la gravité de l'infection (Aucan et al., 2000). Les IgE sont également associés à la gravité de

II. Pathogénèse et immunité antipalustre

l'infection palustre en raison de leur affinité pour certains récepteurs qui sont de puissants inducteurs de cytokines pro-inflammatoires en l'absence de tout signal (Kumsiri et al., 2016; Porcherie et al., 2011). En ce qui concerne les anticorps IgM, ils sont considérés comme marqueur d'exposition récente au parasite (Ly and Hansen, 2019), même chez les enfants dont l'immunité protectrice n'est pas complètement acquise (Oyong et al., 2019).

En conclusion, la réponse immune développée suite à une infection palustre est un processus complexe. Le rôle dichotomique de l'immunité innée et adaptative dans la protection ou la pathogénèse dépend beaucoup de la nature et de l'intensité des cytokines produites. En effet, les cytokines de type I (l'IL-12, l'IFN γ , le TNF, ...) sont les principales protagonistes permettant de limiter le pic de parasitémie, mais doivent être régulées ultérieurement par les cytokines de type 2, notamment l'IL-10 et le TGF β , afin de bloquer une réponse pro-inflammatoire excessive délétère. La **figure 18** résume les interactions entre les principaux acteurs de la réponse immune mise en place au cours de la phase érythrocytaire de l'infection.

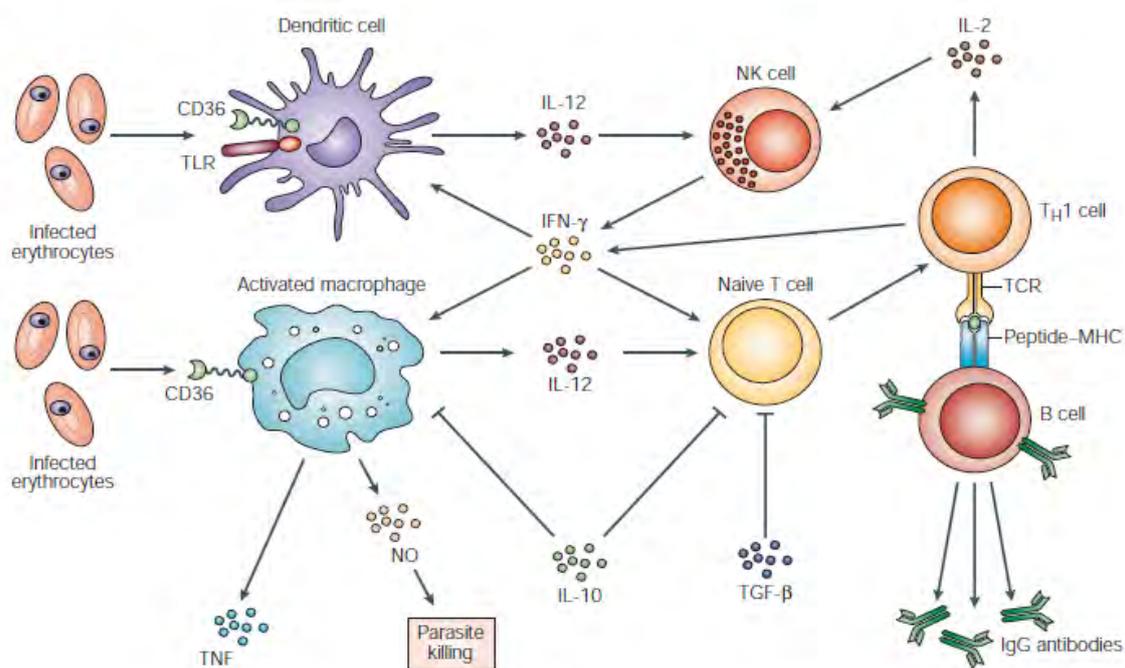


Figure 18 : Immunité innée et adaptative du paludisme au stade sanguin (Stevenson and Riley, 2004).

III. Paludisme et Médecine traditionnelle en Afrique de l'Ouest

1. Définition de la médecine traditionnelle

« Basée sur des connaissances ancestrales, la médecine traditionnelle est la somme de toutes les connaissances, compétences et pratiques reposant sur les théories, croyances et expériences propres à différentes cultures, et qui sont utilisées dans la prévention, le diagnostic, l'amélioration ou le traitement de maladies physiques ou mentales » (OMS, 2000). L'apport de la médecine traditionnelle dans la préservation de la santé humaine est basé sur l'utilisation de plantes et autres substances d'origine animale.

2. Méthodes d'évaluation de l'activité de plantes antipaludiques

Le développement d'un médicament à partir d'une plante médicinale est un processus complexe qui nécessite une approche multidisciplinaire schématisée dans la **figure 19**.

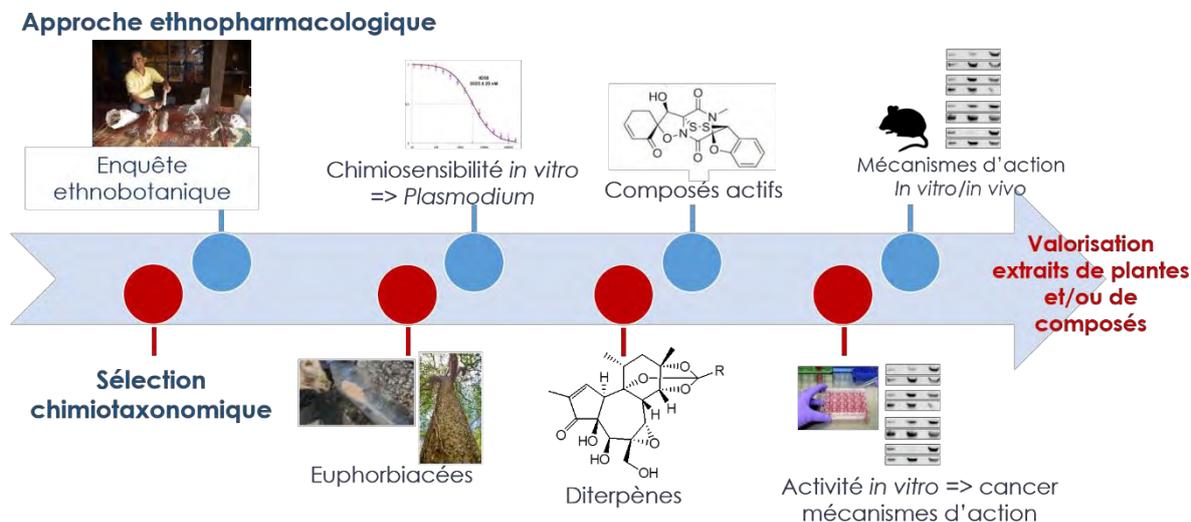


Figure 19 : Approches méthodologiques conduisant à la valorisation d'extraits de plantes ou de composés issus de plantes.

✓ L'approche ethnopharmacologique

La sélection de l'espèce végétale constitue le point de départ pour le développement du phytomédicament. Elle se fait sur base d'une enquête ethnopharmacologique qui consiste à

III. Paludisme et médecine traditionnelle en Afrique de l'Ouest

recueillir les informations ethnomédicales relatives à l'utilisation de la plante selon la tradition (signes et symptômes traités par la plante, parties utilisées, mode de préparation et d'administration) auprès des tradithérapeutes, des herboristes, et de la population dans une communauté donnée. A l'issue de l'enquête ethnopharmacologique, on procède à une première identification et à la récolte des échantillons. Il est important de noter que les plantes peuvent également être sélectionnées par zoo-pharmacognosie (observation des animaux en vue d'identifier les plantes candidates), ou par une approche aléatoire (criblage sur une classe chimique ou sur un ensemble de plante choisi au hasard).

La sélection des plantes est suivie d'une identification botanique, basée sur la description macroscopique et/ou microscopique des plantes, ainsi que sur la confection d'un herbier de référence. L'approche permet d'effectuer les recherches bibliographiques sur les différentes espèces candidates.

Un premier criblage biologique préliminaire est ensuite effectué sur les différentes espèces en vue de valider l'usage conféré par la médecine traditionnelle et de sélectionner les plus actives. Ce processus implique la sélection des plantes (en tenant compte de la fréquence de citations lors des enquêtes ethnomédicales et les données bibliographiques), le séchage/broyage (à température ambiante dans une pièce déshumidifiée), et l'extraction avec des solvants de polarités différentes.

Dans le domaine du paludisme, les essais biologiques préliminaires impliquent des tests *in vitro* réalisés sur des souches de *Plasmodium* chloroquino-résistantes (W2, FcB1, K1, FcM29) et chloroquino-sensibles (3D7, D6, NF54, FCB), couplés à des tests de toxicité. *In vivo*, on mesure l'efficacité antipaludique sur des modèles murins, notamment à *Plasmodium chabaudi*, *vinckei*, *berghei* et *yoelli*. Les critères de jugement varient selon les auteurs et les activités sont généralement classées comme suit :

In vitro : Si la concentration inhibitrice moyenne de 50% de la croissance des parasites (IC_{50}) est inférieure à 5 $\mu\text{g/mL}$, l'activité de l'extrait est considérée comme très bonne; avec une IC_{50} comprise entre 5 et 15 $\mu\text{g/mL}$, on parle d'activité prometteuse ; entre 15 et 50 $\mu\text{g/mL}$, d'activité modérée ; et pour une $IC_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$, la substance est considérée inactive (Muganga et al., 2010). Pour la toxicité, un extrait est considéré comme non-cytotoxique si la concentration cytotoxique moyenne à 50% (CC_{50}) est supérieure à 30 $\mu\text{g/ml}$ (Malebo et al., 2009).

In vivo : Si le pourcentage d'inhibition est $\geq 50\%$, l'extrait est considéré très actif à la dose de 100 mg/kg/jour, avoir une bonne activité à la dose de 250 mg/kg/jour , et à activité modérée à la dose de 1000 à 500 mg/kg/jour et (Muñoz et al., 2000).

III. Paludisme et médecine traditionnelle en Afrique de l'Ouest

Une approche chimique est souvent associée à la biologie en vue d'une identification des molécules responsables des activités observées. En effet, lorsqu'un extrait actif est identifié, la première analyse chimique implique la dérégulation qui permettra de fournir des informations sur la composition chimique de l'extrait. Ensuite, vient le fractionnement de l'extrait guidé par la biologie jusqu'à purification et détermination structurale de la ou des molécule(s) d'intérêt. Cela implique différentes techniques chromatographiques, notamment la chromatographie flash, chromatographie sur colonne, chromatographie sur couche mince préparative, chromatographie liquide haute performance. La détermination structurale est basée sur l'application des techniques spectroscopiques de RMN (1D et 2D), la spectrométrie de masse et la diffraction aux Rayons X si nécessaire.

✓ L'approche par sélection chimiotaxonomique

Cette approche est basée sur la sélection d'une espèce ou famille de plante connue pour sa composition en molécules de structures pertinentes dans le cadre d'une recherche ciblée d'activité particulière. La figure 15 montre l'exemple de la sélection d'Euphorbiacées connues pour leur composition riche en diterpènes, composés d'intérêt dans la recherche de molécules anticancéreuses.

3. Médecine traditionnelle et plantes antipaludiques utilisées en Afrique de l'Ouest

Les plantes représentent une source majeure de produits naturels biologiquement actifs et constituent par conséquent une voie d'investigation particulièrement intéressante pour la mise au point et le développement de nouveaux médicaments. Dans le domaine du paludisme, les plantes ont fourni des pistes importantes à travers les découvertes majeures de la quinine extraite de l'écorce de *Cinchona*, plante sud-américaine, et de l'artémisinine qui a été isolée à partir de *Artemisia annua* originaire de Chine (Bray et al., 2005). Face à cette potentialité thérapeutique, l'OMS recommande l'intégration des médecines traditionnelles dans les systèmes de santé publique, notamment dans les pays en développement (WHO, 1978). Aussi, suite à la déclaration d'Abuja sur le projet « faire reculer le paludisme » (« Roll Back Malaria »), l'Union Africaine a adopté l'usage de la médecine traditionnelle dans la stratégie de lutte contre le paludisme (WHO, 2003).

La biodiversité végétale tropicale concentre la plus forte diversité en métabolites secondaires et offre de belles perspectives dans la découverte de nouvelles molécules bioactive (Adebayo and Krettli, 2011). En Afrique de l'Ouest, précisément au Ghana, Mali, et Nigéria, l'utilisation

des remèdes végétaux constitue le traitement de première intention pour plus de 60% d'enfants souffrants de fièvre palustre (Organization and Mediterranean, 2002). Bien que l'emploi généralisé de ces plantes en Afrique soit dû à son accessibilité, l'insuffisance thérapeutique des médicaments disponibles a suscité un regain d'intérêt pour la médecine traditionnelle dans le but de valider leur usage traditionnel sur des bases scientifiques et de développer des phytomédicaments standardisés, efficaces et abordables pour traiter le paludisme.

Dans les paragraphes suivants, nous citerons pour un certain nombre de pays Ouest africains les études qui ont rapporté des activités antipaludiques remarquables *in vitro* et/ou *in vivo* pour des plantes et, le cas échéant, des molécules isolées à partir de ces plantes.

3.1. Au Nigéria

Au Nigéria, le recours à la médecine traditionnelle dans la gestion du paludisme est très répandu. Une enquête ethnobotanique réalisée au sud du pays a permis de recenser 156 espèces appartenant à 60 familles utilisées en médecine traditionnelle dans le traitement du paludisme dont 15 ont été validées *in vitro* contre la souche *P. falciparum* et *in vivo* dans un modèle expérimental. Parmi les espèces citées, les feuilles d'*Azadirachta indica* ont été largement utilisées par les tradithérapeutes (Iyamah and Idu, 2015). Dans une étude plus ancienne, la validation de leur utilisation traditionnelle a été rapportée *in vitro* contre les souches de *P. falciparum* telles que W2 et D6 avec une IC_{50} de 2,40 $\mu\text{g/mL}$ et 2,50 $\mu\text{g/mL}$. La molécule active de cette plante a ensuite été isolée, molécule du groupe des triterpènes nommée Gedunin, qui a montré une activité remarquable contre les souches W2 ($IC_{50} = 0,020 \mu\text{g/mL}$) et D6 ($IC_{50} = 0,039 \mu\text{g/mL}$). *Azadirachta indica* présente des activités pro-oxydantes qui lui permette d'être active sur tous les stades de maturation des gamétocytes, contrairement à de nombreuses molécules antipaludiques qui ne ciblent que les stades immatures (Adebayo and Krettli, 2011; Dhar et al., 1998). En outre, il a été démontré par une approche *in silico* que les composés phytochimiques d'*Azadirachta indica* interagissent avec la protéine de choc thermique 90 (Hsp90) de *P. faciparum*, substance essentielle à leur croissance (Banumathy et al., 2003; Daniyan and Ojo, 2019).

Dans le même pays, la validation de l'utilisation traditionnelle de *Cocos nucifera* a été démontrée *in vitro* et *in vivo*. Il a été observé que l'extrait acétate d'éthyle de *Cocos nucifera*, composé d'alcaloïdes, de tanins et de flavonoïdes, est actif contre la souche W2 avec une IC_{50} de 9,43 $\mu\text{g/mL}$. Chez des souris infectées par la souche *P. berghei* NK65, cet extrait à la dose

III. Paludisme et médecine traditionnelle en Afrique de l'Ouest

de 31,25 ; 62,5 et 125 mg/kg a permis de réduire la parasitémie avec des pourcentages d'inhibition supérieur à 50% du 4^{ème} aux 6^{ème} jour d'infection (Adebayo et al., 2013).

3.2. Au Mali

Au Mali, la médecine traditionnelle reste la principale ressource pour une grande majorité de la population dans le traitement de diverses maladies, dont le paludisme. De nombreuses investigations ethnobotaniques ont permis de faire un état des lieux des différentes espèces végétales largement employées dans le contrôle du paludisme. Au Mali, plusieurs plantes ont été valorisées sous forme de médicament traditionnel amélioré (MTA) et font partie des médicaments couramment prescrits par les médecins (Graz et al., 2010; Haidara et al., 2016). *Argemone mexicana* (*A. mexicana*) a même fait l'objet d'un essai clinique qui a comparé son efficacité à celle de l'artésunate-amodiaquine, ACT de première intention dans de nombreux pays d'Afrique. Dans cet essai, l'extrait total a montré une efficacité thérapeutique similaire à l'artésunate-amodiaquine (89% pour *A. mexicana* contre 95% pour l'ACT) chez des enfants de moins de 5 ans souffrant de paludisme simple et a permis de limiter la survenue de paludisme sévère (Graz et al., 2010). *Zanthoxylum zanthoxyloides*, une autre plante d'intérêt également connue dans d'autres pays d'Afrique de l'Ouest, a permis de mettre en évidence des alcaloïdes présentant des activités antiplasmodiales *in vitro* contre la souche chloroquino-sensible 3D7 avec des IC₅₀ comprises entre 0,4 à 4 µg/mL (Goodman et al., 2019). De plus, Haidara et al. ont montré *in vitro* et *in vivo* une activité remarquable pour la plante *Terminalia macroptera* contre la souche FcB1 de *P. falciparum* avec des IC₅₀ de 1,2 µg/mL pour les feuilles et 1,6 µg/mL pour les racines. Aussi, *in vivo*, un effet non négligeable dans la résolution parasitaire chez les souris infectées par *P. chabaudi* a été observé avec les feuilles et racines de *T. macroptera* (37,2 et 46,4% respectivement) à la dose de 100 mg/kg (Haidara et al., 2018).

3.3. Au Ghana

Onze plantes largement utilisées en médecine traditionnelle ghanéenne ont fait l'objet d'une investigation biologique *in vitro* et *in vivo* pour évaluer leur effet antipaludique. Seule une plante a montré une activité remarquable contre la souche FCB chloroquino-sensible (IC₅₀ = 4.43 µg/mL), six plantes ont montré une activité prometteuse (5 < IC₅₀ < 15 µg/mL), trois plantes une activité modérée (15 < IC₅₀ < 50 µg/mL) et une plante était inactive. De plus, deux de ces plantes les plus utilisées (*Bidens pilosa* et *Clappertonia ficifolia*) ont été testées *in vivo* contre *P. berghei anka* et ont montré un effet antipaludique intéressant avec réduction de la

densité parasitaire de 74,7% et 62,6% respectivement à la dose de 400 mg/kg (Laryea and Borquaye, 2019).

En plus de fournir un répertoire de plantes médicinales employées dans le traitement du paludisme au Ghana (Komlaga et al., 2015), l'équipe de Gustav Komlaga a effectué des travaux portant sur l'évaluation *in vitro* de plusieurs espèces de plantes contre la souche chloroquino-sensible 3D7. Dans cette étude, bien que les extraits aqueux de *T. ivorensis* ($IC_{50} = 0,64 \mu\text{g/mL}$) et *P. fraternus* ($IC_{50} = 4,07 \mu\text{g/mL}$) soient significativement actifs *in vitro*, ces deux plantes ont montré une cytotoxicité importante ($CC_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$). En revanche, les extraits organiques tels que l'éther de pétrole ($IC_{50} = 0,75 \mu\text{g/mL}$), l'acétate d'éthyle ($IC_{50} = 0,49 \mu\text{g/mL}$) de *B. vulgaris*, l'extrait méthanolique ($IC_{50} = 0,92 \mu\text{g/mL}$) de *T. grandis* et *P. Fraternus* ($IC_{50} = 0,44 \mu\text{g/mL}$) ont montré des activités remarquable avec des indices de sélectivité supérieurs à 200 (Komlaga et al., 2016).

3.4. Au Burkina Faso

Au Burkina Faso, une investigation phytochimique et biologique a permis d'identifier l'activité antiplasmodiale de certaines plantes utilisées dans le traitement traditionnel du paludisme. Les alcaloïdes totaux de *Combretum collinum*, *Combretum fragrans*, *Pavetta crassipes*, et *Zanthoxylum zanthoxyloide* ont montré une activité remarquable contre la souche K1 de *P. falciparum* ainsi que l'extrait méthanolique de *T. avicenioides* dont le composé actif est l'acide ellagique (Ouattara et al., 2014). De plus, une étude similaire a prouvé l'effet antiplasmodial des extraits dichlorométhane et méthanol de *Dicoma tomentosa*, et *Psorospermum senegalense* contre les souches 3D7 et W2 avec des IC_{50} comprises entre 3,63 et 7,90 $\mu\text{g/mL}$ (Jansen et al., 2010).

3.5. Au Bénin

En 2011, au Bénin, les isolats de *P. falciparum* résistants à la chloroquine, obtenus à partir de patients impaludés, ont été utilisés *in vitro* pour valider l'effet antipaludique de *Rytigynia canthioides* ainsi que deux sous-espèces de *Flacourtia flavescens* issues de la pharmacopée traditionnelle. De bonnes concentrations inhibitrices moyennes ont été obtenues pour les extraits, principalement pour l'extrait méthanolique des feuilles de *F. flavescens* "femelle" ($IC_{50} = 1,55 \mu\text{g/mL}$), et racines de *F. flavescens* "mâle" ($IC_{50} = 1,95 \mu\text{g/mL}$) (Agassounon Djikpo-Tchibozo et al., 2010).

3.6. En Côte d'Ivoire

En Côte d'Ivoire, *Ancistrocladus abbreviatus* est une plante connue pour son large spectre d'alcaloïdes de naphthylisoquinoléine et utilisée en médecine traditionnelle pour diverses pathologies dont le paludisme. Un récent rapport a étudié l'effet antiprotozoaire des alcaloïdes de cette plante récoltée au Sud-Ouest de la Côte d'Ivoire. La valeur d'IC₅₀ ≤ 2 µg/mL a été obtenue contre les souches de *P. falciparum* K1 et NF54 (Fayez et al., 2018).

Dans le même pays, les feuilles de *Ziziphus mauritiana* et l'écorce de tige d'*Anthocleista djalonensis* ont fait l'objet d'investigations biologiques *in vitro* sur des isolats de *P. falciparum*, sur la souche chloroquino-résistante K1 et *in vivo* dans le modèle d'infection à *P. berghei* ANKA. Les extraits hydroéthanoliques d'*Anthocleista djalonensis* et de *Ziziphus mauritiana* ont montré une activité antipaludique prometteuse bien que modérée contre les isolats cliniques et la souche K1 de *P. falciparum*, respectivement. *In vivo*, une suppression significative de la densité parasitaire de 88% pour *Z. mauritiana* et 70% pour *A. djalonensis* a été observée à la dose de 600 mg/kg, associée à une meilleure survie des souris (Attemene et al., 2018).

3.7. Au Togo

Au Togo, une enquête ethnobotanique a permis de sélectionner 61 espèces appartenant à 33 familles de plantes utilisées de manière traditionnelle contre le paludisme, avec une prédominance des *Caesalpiniaceae* et *Euphorbiaceae* (Agbodeka et al., 2016).

3.8. Au Niger et Sénégal

Au Sénégal ainsi qu'au Niger, deux plantes traditionnelles ont été sélectionnées à partir de données ethnobotaniques pour des investigations phytochimiques et biologiques dans le domaine du paludisme. Les extraits aqueux de *Sebastiania chamaelea* du Niger et *Chrozophora senegalensis* du Sénégal ont été évalués *in vitro* contre différentes souches de *P. falciparum*, ce qui a permis de montrer une activité significative des feuilles de *C. senegalensis* avec des IC₅₀ comprises entre 0,3 et 1,9 µg/mL et une forte teneur en acide ellagique (4,3%). De plus, la plante *S. chamaelea* a montré *in vitro* un effet synergique remarquable avec la chloroquine contre la souche W2 chloroquino-résistante. Dans la même étude, l'effet prophylactique et curatif a été évalué *in vivo* contre la souche murine *P. vinckei petteri*. L'administration quotidienne de *C. senegalensis* à 25 mg/kg par voie intrapéritonéale pendant 14 jours avant l'infection a été associée à une réduction de 75% de la parasitémie comparativement à *S. chamaelea* du Niger qui n'a montré aucun effet prophylactique ; cette absence d'activité a été

III. Paludisme et médecine traditionnelle en Afrique de l'Ouest

attribuée à sa faible teneur en acide ellagique. Cependant, aucune activité curative *in vivo* n'a pu être observée pour les deux extraits, même à forte dose. Selon les auteurs, la faible métabolisation des extraits par les souris pourrait expliquer cette inactivité curative. Ainsi, l'étude a permis de mettre en évidence l'effet antipaludique de l'acide ellagique dans les deux échantillons de plantes (Garcia-Alvarez et al., 2013).

Le **tableau 2** présente les principales molécules isolées de plantes africaines qui ont présenté une activité antipaludique intéressante.

Tableau 2 : Principales molécules isolées à partir de plantes utilisées en médecine traditionnelle dans le traitement du paludisme.

Famille	Plantes sources	Molécules principalement responsables de l'activité	IC ₅₀ en µg/mL (souche utilisée)	Référence
Meliaceae	<i>Azadirachta indica</i>	Gedunin	0,020 (W2) 0,039 (D6)	(Adebayo and Krettli, 2011)
Connaraceae	<i>Rourea minor</i>	Rourinoside	3,66 (D6) ; 2,10 (W2)	(He et al., 2006)
		Rouremine	5,09 (D6) ; 4,49 (W2)	
Ancistrocladaceae	<i>Ancistrocladus abbreviatus</i>	Ancistrobrevine E	0,213 (NF54)	(Fayez et al., 2018)
		5-epi-Ancistrobrevine E	0,663 (NF54)	
		Ancistrobrevine F	0,928 (NF54)	
		5-epi-Ancistrobrevine F	0,846 (NF54)	
		Ancistrobrevine G	0,134 (NF54)	
Euphorbiaceae	<i>Chrozophora senegalensis</i>	Acideellagique	0,17 (FcM29)	(Garcia-Alvarez et al., 2013)
Fabaceae	<i>Mezoneuron benthamianum</i>	13b-OH-pheophorbide a	5,1 (3D7)	(Jansen et al., 2017)
Lamiaceae	<i>Salvia leriifolia</i>	Leriifoliol	0,4µM (NF54)	(Farimani et al., 2018)
Loganiaceae	<i>Strychnos malacoclados</i>	Divarine	0,83(3D7) ; 0,30 (W2)	(Tchinda et al., 2012)
		Longicaudatine	0,39 (3D7) ; 0,33 (W2)	
		Longicaudatine Y	0,86 (3D7) ; 0,41 (W2)	
		Longicaudatine F	6,69 (3D7) ; 0,615 (W2)	

4. Exemple de plantes consommées sous forme de Médicaments Traditionnels Améliorés (MTA)

Les différentes investigations phytochimiques et biologiques des plantes largement employées par la population locale pour la gestion des affections palustres a permis de valider leur usage traditionnel. Cette validation scientifique permet de définir des MTA dont la formulation et la posologie sont rationalisés, dans le but de vendre ces produits en pharmacie. Cette dénomination de MTA a été adoptée par plusieurs pays, essentiellement d'Afrique francophone, dont le Mali, pionnier dans ce domaine, mais également le Bénin, le Burkina Faso, le Ghana, la Côte d'Ivoire et le Nigéria. Le tableau 3, présente quelques MTA approuvés par le gouvernement des pays correspondants.

Tableau 3 : Exemples de Médicaments Traditionnels Améliorés (MTA) utilisés dans le traitement du paludisme.

MTA	Plantes d'intérêt	Partie de la plante	Forme galénique	Pays	Référence
Api-palu	<i>Elaeis Guineensis</i>	Feuilles	Sirop Gélules	Bénin	N° brevet WO 2007/129136 A1
Malarial	<i>Senna occidentalis</i> (62%) <i>Lippia chevalieri</i> (32%) <i>Acmella oleracea</i> (6%)	Feuilles séchées	Décoction	Mali	(Willcox, 2011; Willcox et al., 2012)
Soumafoura Tiemoko Bengaly	<i>Argemone mexicana</i> L.	Parties aériennes	Décoction		
Phyto-laria	<i>Cryptolepis sanguinolenta</i>	Racines	Décoction	Ghana	
N'dribala	<i>Cochlospermum planchonii</i>	Racines	Décoction	Burkina Faso, Côte d'Ivoire, Nigeria	

5. Le cas de la Guinée

5.1. Données géographiques

La république de Guinée est un pays côtier d'Afrique de l'Ouest, entre 7°30 et 12°30 de latitude nord et 8° à 15° de longitude Ouest. Elle a une superficie de 245,857 km². Sur le plan démographique, la république de Guinée compte 13,63 millions d'habitants en 2019 avec une densité de 51,8 habitants/Km². Le taux de croissance démographique est de 2,6% par an avec une espérance de vie estimée à 61ans. Elle est limitée au Nord par le Sénégal, au Nord-Est par le Mali, au Nord-Ouest par la Guinée-Bissau, à l'Ouest par l'océan Atlantique, à l'Est par la Côte d'Ivoire, et au Sud par la Sierra Leone et le Libéria (**Figure 20**). La Guinée est divisée en quatre régions géographiques distinctes :

- La Basse-Guinée ou Guinée maritime située en bordure de l'Atlantique ;
- La Moyenne-Guinée au sud du Sénégal avec des massifs montagneux et des hauts plateaux latéritiques ;
- La Haute-Guinée, immense savane vers le Mali ;
- La Guinée-forestière, région de montagne couverte de forêt, près du Libéria.

Sur le plan administratif, elle est composée de 8 régions administratives dont Conakry, la capitale et ses cinq communes, la région de Boké, Kindia, Mamou, Labé, Faranah, Kankan et Nzérékoré (Figure 20). La population est caractérisée par une diversité d'ethnies parlant chacune leur langue dont les principales sont les Peuls (32,1%), les Malinkés (29,8%), les Soussous (19,8%), les Guerzés (6,2%), les Kissis (4,7%) et les Tomas (2,8%). La religion principale est l'islam (86,2%), suivent le christianisme (9,7%) et l'animisme (4,1%). L'industrie minière (37%), l'agriculture (20%) et les services publics (43%) constituent la base de l'économie du pays. Le climat est tropical et composé de deux saisons : la saison sèche (Novembre à Mai) et la saison pluvieuse (Juin à Octobre). La végétation dépend du type de climat (Anonymous 2018; Ministère des Affaires étrangères 2019; Traore et al., 2013).



Figure 20 : Carte de la République de Guinée avec les régions administratives (EDS-MICS 2012).

5.2. Prévalence et épidémiologie du paludisme en Guinée

En Guinée, le paludisme constitue un problème de santé publique majeur. Toute la population est exposée à un risque de paludisme avec une prévalence estimée à 15% chez les enfants de moins de 5 ans (Sun et al., 2018). Selon une enquête démographique et de santé en Guinée (EDS-MICS 2012), la prévalence du paludisme est variable dans les 8 régions administratives (Figure 16) : 3% à Conakry, 24 % à Boké, 37% à Labé, 47% à Mamou, 50% à Kankan, 55% à Kindia, 66% à Faranah, et 59% à Nzérékoré. Ainsi, un récent rapport de l’OMS indique que le paludisme constitue la principale cause de consultation dans les structures sanitaires (40,8%) dont 36% des décès lui sont imputables (OMS, 2017). Il sévit toute l’année avec des périodes de haute transmission de juillet à octobre (saison des pluies). Les trois principaux vecteurs de transmission sont *Anopheles gambiae*, *An. coluzzii* et *An. funestus* avec une augmentation de la résistance d’*Anopheles gambiae* aux insecticides. *P. falciparum* reste le principal parasite responsable de 92% des infections palustres (Collins et al., 2019; USAID 2018). En 2016, le taux d’incidence annuel des cas de paludisme confirmés était estimé à 87

III. Paludisme et médecine traditionnelle en Afrique de l'Ouest

pour 1000 habitants (USAID 2018). Il est important de noter qu'il existe 4 zones d'endémicité différentes en Guinée (EDS-MICS 2012):

1/ La zone hypo-endémique qui se trouve en Basse Guinée, constituée de deux foyers sur la façade atlantique (les villes de Conakry et Kamsar).

2/ La zone méso-endémique qui concerne la partie nord frontalière du Sénégal et du Mali, à pluviométrie faible où le vecteur majeur est *An. funestus*, et la façade atlantique à pluviométrie élevée.

3/ La zone hyper-endémique qui correspond au Sud-Est de la Basse Guinée, zone de forêt tropicale guinéenne (Frontière du Liberia et de la Côte d'Ivoire). Il s'agit d'une zone de forte pluviométrie (6 à 10 mois de pluie par an).

4/ La zone holoendémique en Haute Guinée, zone de savane et de plaine fortement irriguée à pluviométrie moyenne.

5.3. Paludisme et médecine traditionnelle en Guinée

Depuis 1973, de nombreuses recherches ont été menées sur les plantes médicinales et la médecine traditionnelle guinéennes tant par les universités que par les institutions publiques et privées spécialisées, comme le Centre de Recherche sur les Plantes Médicinales et Industrielles de Sérédou, le Service National de la Médecine Populaire, les Facultés de Pharmacie et de Biologie des Universités guinéennes, les entreprises « Pharmaguinée » et « Eniphargui » et depuis 2000, l'Institut de recherche et de développement des plantes médicinales et alimentaires de Guinée (IRDPMAG). Ces recherches ont porté autant sur la recherche de compléments alimentaires que sur des plantes permettant de traiter diverses pathologies transmissibles et non transmissibles comme le paludisme. Ainsi, grâce aux enquêtes ethnobotaniques réalisées par l'IRDPMAG auprès des tradithérapeutes, l'existence d'un répertoire de plantes antipaludiques, ainsi que la validation biologique de certaines espèces ont permis d'engager des recherches approfondies telles que la validation thérapeutique des feuilles de *Caesalpinia benthamiana* chez les enfants atteints de paludisme simple (Loua et al., 2017), et l'identification des molécules bioactives de *Caesalpinia benthamiana* contre la souche 3D7 de *P. falciparum* (Jansen et al., 2017). Parallèlement à ces travaux, d'autres études portant sur l'évaluation thérapeutiques de deux plantes antipaludiques issues de la pharmacopée traditionnelle guinéenne sont en cours afin de permettre leur utilisation rationnelle et de mettre au point des phytomédicaments standardisés, efficaces et accessibles à tous.

IV. Travaux personnels

Chapitre 1 : Etude de l'activité antipaludique de trois plantes issues de la médecine traditionnelle guinéenne

1. Introduction

Recensées au cours des enquêtes ethnobotaniques, *Terminalia albida*, *Desmodium velutinum* et *Rourea minor* sont trois plantes largement employées en médecine traditionnelle guinéenne, notamment contre le paludisme. Elles figurent parmi les plantes d'intérêt ciblées pour des études ethnopharmacologiques et biologiques par l'IRDPMAG.

Ainsi, ce travail vise à évaluer les activités antiplasmodiales de ces trois espèces *in vitro* et dans des modèles de paludisme murin, ainsi que leurs effets sur la modulation de l'immunité. Pour atteindre ce but, les objectifs spécifiques de ce travail sont les suivants :

- Déterminer l'activité antiplasmodiale des extraits bruts *in vitro* et sur modèles murins,
- Evaluer l'effet des extraits les plus actifs sur la modulation de l'immunité,
- Identifier les groupes chimiques responsables de l'activité.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Matériel végétal

Les feuilles de *D. velutinum* ainsi que les écorces de tige de *R. minor* et *T. albida* ont constitué le matériel végétal sur lequel nous avons réalisé nos études phytochimiques et biologiques. *D. velutinum* et *R. minor* ont été récoltées à Labé (Moyenne Guinée) en mai 2016. *T. albida* a été récoltée à deux endroits différents : à Tokounou dans la sous-préfecture de Kankan (Haute Guinée, une zone sèche de savane herbeuse) et à Danaya dans la préfecture de Dubréka (Basse Guinée, une zone humide dominée par la mangrove) le 28 mai 2016 et le 17 juin 2018, respectivement. Ces deux récoltes différentes ont conduit à des extraits qui ont été étudiés de manière indépendante et dénommés dans la suite du document comme *TaK* et *TaD*. Les identifications botaniques ont été effectuées à Kôpèrè (Préfecture de Dubréka) par le Département de botanique de l'IRDPMAG où des spécimens de référence pour *D. velutinum*

(107HK637) *R. minor* (40HK465), *T. albida* de Dubréka (38HK 457) et *T. albida* de Kankan (38HK461), ont été déposés. Le matériel végétal a été séché à la température ambiante du laboratoire pendant trois semaines et pulvérisé à l'aide d'un broyeur.

2.2. Matériel biologique

Les modèles murins d'infection à *P. chabaudi* pour le paludisme simple et à *P. berghei ANKA* pour le neuropaludisme, ont été utilisés dans l'équipe MRN2i de l'UMR PHARMADEV. Les expériences *in vitro* ont été réalisées sur la souche chloroquino-résistante *PfK1* par le laboratoire de Microbiologie, Parasitologie et Hygiène du département des Sciences Pharmaceutiques d'Anvers (Belgique). Enfin, la cytotoxicité a été déterminée sur des macrophages péritonéaux de souris C57BL/6 dans l'équipe MRN2i de PHARMADEV à Toulouse.

2.3. Matériel animal

Des souris C57BL/6 âgées de 14 semaines maximum et pesant 20 à 25 g ont été obtenues à l'animalerie PHARMADEV à Toulouse, en France. Les souris ont été maintenues dans des conditions de laboratoire standards et constantes (température de 23 à 25 ° C et cycles de lumière / obscurité toutes les 12 h) avec un libre accès à la nourriture et à l'eau. Les exigences en matière de bien-être animal ont été rigoureusement prises en compte lors des expérimentations selon les recommandations du comité d'éthique Midi-Pyrénées pour l'expérimentation animale à Toulouse, en France. L'étude a été autorisée avec le numéro de permis APAFIS # 5921-2016070118008477 v3.

2.4. Méthodes d'extraction

Les plantes ont été préparées par macération pendant 24 heures suivant les conditions décrites par Traore et al. (Traore et al., 2014). Les poudres (100 g) des feuilles de *D. velutinum* et d'écorce de tige de *R. minor* ont été diluées dans 1 litre de dichlorométhane. Pour *T. albida*, les deux échantillons de Dubréka et Kankan (*TaD* et *TaK*) ont été traités avec du méthanol pur. Les macérés ont ensuite été filtrés et évaporés sous pression réduite (évaporateur rotatif Büchi®, modèle R-200). Les extraits séchés ont été conservés à -20 °C jusqu'à leur utilisation.

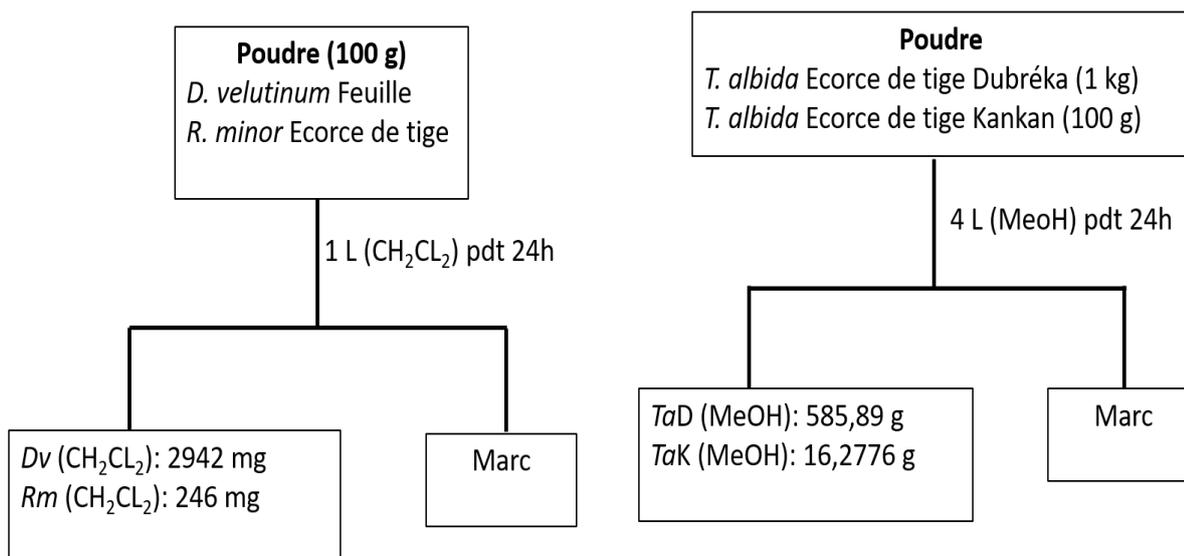


Figure 21 : Schéma d'extraction général des différentes espèces

2.5. Prélèvement des macrophages et test de cytotoxicité *in vitro* des extraits

Des macrophages péritonéaux de souris C57BL/6 saines et âgées de 15 à 20 semaines ont été prélevés par lavage de la cavité péritonéale avec 5 mL de NaCl 0,9% stérile. La suspension cellulaire a été centrifugée à 1500 tr/min pendant 10 minutes. Le culot a été remis en suspension dans 47 mL du milieu Eagle's modifié de Dulbecco (InVitrogen) supplémenté avec 500 µl de glutamine 2 mM (InVitrogen), pénicilline/streptomycine 100 u/100 µg/mL (InVitrogen) et 5% de sérum de veau foetal inactivé à la chaleur. Les cellules (2.10⁵ cellules/puits) ont été mises à adhérer pendant 2 heures à 37°C, 5% CO₂, puis les cellules non adhérentes ont été éliminées par deux lavages au PBS. Les cellules adhérentes ont été ensuite traitées avec différentes concentrations d'extraits (100 µg/mL, 10 µg/ml, 0,1 µg/mL) et incubées pendant 24 heures à 37°C, 5% CO₂. Les extraits ont été dissous en DMSO, avec une teneur maximum de 1% dans les dilutions testées. Après 24 heures d'incubation, 100 µL/puits de triton 2% ont été ajoutés dans les puits des témoins positifs. La plaque a alors été incubée pendant 30 minutes afin de permettre une lyse cellulaire complète. Au bout de 30 min, 50 µL de surnageant de chaque puits a été transféré dans une nouvelle plaque 96 puits sur lesquels 50 µL/puits de lactate déshydrogénase (LDH) (Cytotoxicity detection Kit, Roche, France) a été ajouté. La plaque a été mise à l'abri de la lumière pendant 30 min puis l'absorbance a été mesurée à 490 nm avec un compteur Walac Victor² 1420 Multilabel COUNTER. La mortalité cellulaire a été calculée en pourcentage (absorbance des puits traités avec l'extrait * 100 / absorbance des puits traités au triton). Chaque condition expérimentale a été analysée en triplicat.

2.6. Activité antiplasmodiale *in vitro*

Des tests *in vitro* ont été effectués dans le laboratoire de microbiologie, de parasitologie et d'hygiène du Département des sciences pharmaceutiques d'Anvers (Belgique). L'activité antiplasmodiale des extraits a été évaluée selon la méthode décrite par Tuentler (Tuentler et al. 2016).

Le test a été effectué sur la souche de *P. falciparum* chloroquino-résistante *K1*. La souche a été cultivée dans du RPMI 1640 supplémenté en pénicilline-streptomycine 2%, hypoxantine 0,37 mM, HEPES 25mM, NaHCO₃ 25 mM, sérum humain 10%, et en présence de globules rouges humains à un hématoците de 4%. La culture a été maintenue à 37°C sous une atmosphère micro-aérophile et enrichie en CO₂ (5%), O₂ (5%), N₂ (90%). La détermination de l'activité antiplasmodiale a été effectuée par dosage de la lactate déshydrogénase de *P. falciparum* (Pf LDH). Les extraits à tester ont été dissous dans du DMSO et dilués avec du milieu de culture. Les essais ont été réalisés dans une plaque de 96 puits chacun contenant des concentrations croissantes d'extrait à tester ainsi que l'inoculum parasitaire (1 % parasitémie, 2% hématoците). Après 72 heures d'incubation à 37°C, la plaque a été stockée à -20 °C jusqu'au prochain traitement. Après décongélation, 20 µl de la suspension parasitaire hémolysée ont été prélevés dans chaque puits et transférés dans une nouvelle plaque contenant 100 µl du réactif de Malstat™ et 10 µl d'un mélange 1/1 de phenazine ethosulphate à 2 mg/ml et de nitroblue tetrazolium à 0,1 mg/ml. La plaque a été maintenue 2 heures à l'obscurité puis le changement de couleur a été mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre à la longueur d'onde de 655 nm. Les résultats ont été exprimés en pourcentage de réduction de la parasitémie en comparaison avec la chloroquine, choisie comme référence, et les valeurs d'IC₅₀ ont été déterminées à partir des courbes de réponse au médicament. Chaque échantillon a été testé en triplicat.

2.7. Activité antipaludique *in vivo*

Suivant le test standard de suppression de 4 jours décrit par Knight et Peters (Knight and Peters, 1980), l'effet antipaludique de nos différents extraits a été évalué *in vivo* dans deux modèles murins à *P. chabaudi* pour le paludisme simple, et *P. berghei anka* pour le neuropaludisme. Pour chaque modèle d'infection, trente-six souris C57BL/6 femelles âgées de 10 à 12 semaines ont été divisées au hasard en six groupes de six souris. Les 6 groupes de traitement étaient les suivants : 1/ extrait CH₂CL₂ des feuilles de *D. velutinum* (*Dv*), 2/ extrait CH₂CL₂ des écorces de tige de *R. minor* (*Rm*), 3/ extrait MeOH de *T. albida* issu de Dubréka (*TaD*), 4/ extrait MeOH

de *T. albida* issus de Kankan (*TaK*), 5/ chloroquine (contrôle positif), 6/ eau distillée (contrôle négatif). Le premier jour (J0), les souris ont été infectées par voie intrapéritonéale avec 200 μ l de suspension parasitaire contenant 1×10^6 érythrocytes parasités. Deux heures après l'infection, les souris, selon leur groupe, ont été traitées par gavage avec 100 mg/kg de *T. albida* Dubréka ou *T. albida* Kankan, 60 mg/kg de *R. minor* et 50 mg/kg de *D. velutinum*. Ces concentrations ont été déterminées sur des critères de cytotoxicité (voir résultats). Les souris témoins positives et négatives ont reçu 5 mg/kg de chloroquine et 25 ml/kg d'eau distillée, respectivement. Les extraits ont été dissous dans de l'eau distillée et ont été administrés par gavage pendant 4 jours consécutifs à la même heure (J0 – J3). Afin d'évaluer l'état clinique, les souris ont été pesées quotidiennement pour calculer la différence de poids entre J0 et les jours post-infection. La parasitémie des souris infectées a été mesurée quotidiennement en réalisant des frottis sanguins minces à partir du sang de la queue du 3^{ème} au 20^{ème} jour d'infection. Les lames de frottis ont été fixées et colorées à l'aide d'un kit de coloration rapide basé sur le May-Grünwald Giemsa (kit RAL 555, diagnostics RAL). La parasitémie a été déterminée par microscopie optique à l'aide d'un objectif 100 \times comme suit : % parasitémie = $100 \times (\text{nombre de globules rouges parasités} / \text{nombre total de globules blancs})$. Le pourcentage moyen de chimio-suppression a été calculé à J10 pour le modèle *chabaudi* ; J5, J7 et J8 pour le modèle *berghei ANKA* par la formule suivante : $[(A - B) / A] \times 100$, où A est le pourcentage moyen de parasitémie dans le groupe témoin négatif et B est le pourcentage moyen de parasitémie dans le groupe test. Enfin, la survie a été contrôlée deux fois par jour. Le pourcentage de survie a été déterminé sur une période de 20 jours et comparé entre les groupes.

2.8. Analyses statistiques

Le test d'ANOVA unidirectionnel a été utilisé pour les comparaisons de moyennes. Les comparaisons entre les groupes ont été effectuées avec la méthode de comparaison multiple de Bonferroni Dunnett. Les valeurs de $P < 0,05$ ont été considérées comme significatives.

3. Résultats

3.1. Activité *in vitro* antiplasmodiale et cytotoxicité des extraits

Les différents extraits préparés dans les conditions identiques aux précédents travaux ont été évalués *in vitro* contre la souche chloroquino-résistante *PfK1* et leurs cytotoxicités ont été mesurées sur les monocytes humains par dosage de la lactate déshydrogénase relarguée lors de

la lyse cellulaire. Les activités antiplasmodiales ont été classées suivant la méthode de classification rapportée par Muganga (Muganga et al., 2010): $IC_{50} < 5 \mu\text{g/mL}$ = très bonne activité ; $5 < IC_{50} \leq 15 \mu\text{g/mL}$ = activité prometteuse ; $15 < IC_{50} \leq 50 \mu\text{g/mL}$ = activité modérée, et $IC_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$ = aucune activité.

Une bonne activité antiplasmodiale a été obtenue contre *Plasmodium falciparum* *PfK1* pour l'extrait méthanolique de *TaD* ($IC_{50} = 1,5 \mu\text{g/mL}$) récolté à Dubréka tandis que *TaK* et *D. velutinum* ont montré des activités prometteuses avec des IC_{50} de $8,5 \mu\text{g/mL}$ et $14,38 \mu\text{g/mL}$, respectivement. Par ailleurs, seul l'extrait chloroformique de *R. minor* a montré une activité modérée avec une IC_{50} de $28,2 \mu\text{g/mL}$ (voir le **Tableau 4**). Les tests de cytotoxicité *in vitro* n'ont montré aucune toxicité sur les macrophages péritonéaux de souris à la dose de $100 \mu\text{g/mL}$.

Tableau 4 : Activité antiplasmodiale et cytotoxique *in vitro* des extraits de *D. Velutinum*, *R. minor* et *T. albida*.

Extraits de plantes	Cytotoxicité sur macrophages péritonéaux murins, DL_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	<i>PfK1</i> (CQR) Anvers 2016/2018
<i>D. velutinum</i>		
<i>Dv</i> CH_2Cl_2	> 100	14,38
<i>R. minor</i>		
<i>Rm</i> CH_2Cl_2	> 100	28,21
<i>T. albida</i>		
<i>Ta</i> MeOH Kankan	> 100	8,5
<i>Ta</i> MeOH Dubréka	> 100	1,5

Dv CH_2Cl_2 : *D. velutinum* extrait dichlorométhane
Rm CH_2Cl_2 : *R. minor* extrait dichlorométhane
Ta MeOH : *T. albida* extrait méthanolique

3.2. Evaluation *in vivo* de l'activité des extraits de plantes contre les souches *P. chabaudi chabaudi* (*Pcc*) et *P. berghei* ANKA (*PbA*)

En complément des essais *in vitro*, nous avons évalué l'activité antiplasmodiale de tous les extraits selon le test suppressif de 4 jours réalisé avec *Pcc* et *PbA*. Comme décrit précédemment, le modèle *chabaudi* non léthal se caractérise chez les souris sensibles, telles que les C57BL/6, par une perte de poids, une anémie et une parasitémie qui atteint son maximum entre 7 et 10 jours après l'infection, suivie d'une phase chronique qui se manifeste par la résolution spontanée

de la densité parasitaire en raison de la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative (Langhorne, 1989; Namazi and Phillips, 2010). Quant à la souche *PbA*, elle se manifeste par des symptômes neurologiques tels que la paralysie, l'ataxie et la déviation de la tête, symptômes dus à une séquestration marquée des cellules immunitaires et de globules rouges infectés dans le cerveau, conduisant à une mortalité prématurée des souris à partir de J6 (Brian de Souza and Riley, 2002; Hearn et al., 2000; Lou et al., 2001).

Le test suppressif de 4 jours nous a permis d'évaluer l'activité antiplasmodiale des extraits dans le modèle murin. L'effet thérapeutique des extraits a été interprété comme suit : à la dose de 100 mg/kg, un pourcentage d'inhibition parasitaire de 50% ou plus a été considéré comme très actif. En revanche, à la dose de 50 ou 60 mg/kg, les extraits ont été considérés actifs à partir de 30% d'inhibition parasitaire. Cette classification a été adaptée de Muñoz *et al.* (Muñoz et al., 2000).

Comme l'illustre le **tableau 5** ainsi que les **figures 22a** et **23a**, les extraits de *T. albida* de Dubréka et *D. velutinum* ont été les plus actifs dans le modèle *chabaudi* à J10 pendant la phase aigüe de l'infection. Les pourcentages d'inhibitions de la densité parasitaire étaient de 56% pour *T. albida* à la dose de 100 mg/kg et 31% pour *D. velutinum* à la dose de 50 mg/kg. Les autres traitements étaient inactifs. L'inhibition était de 13% pour *R. minor* à 65 mg/kg et 14 % pour *T. albida* Kankan à 100 mg/kg.

Par ailleurs, dans l'infection à *PbA*, la parasitémie a été comparée à J5, J7 et J8 en raison de la mortalité prématurée des souris. A J5, une faible inhibition de la densité parasitaire a été observée dans les groupes traités par *D. velutinum* et *R. minor* accompagné de symptômes neurologiques importants. Dans le groupe des *T. albida*, bien que l'extrait de *T. albida* en provenance de Kankan ait montré une bonne activité à J5 (63% d'inhibition), l'activité était faible à J7 (35%) et J8 (19%) contre *P. berghei* ANKA (**Tableau 4**). Cependant, le traitement par *T. albida* issu Dubréka était similaire à la chloroquine (100% d'inhibition) à J5 ; avec une activité antiparasitaire remarquable à J7 (89%) et J8 (61%) comparativement au groupe non traité et au groupe traité avec *T. albida* de Kankan (**Tableau 5** ; **Figure 22b** et **Figure 23b**).

Tableau 5 : Pourcentage d'inhibition de la densité parasitaire chez les souris infectées avec *P. chabaudi chabaudi* ou *P. berghei ANKA* après traitement avec les extraits de plantes guinéennes.

Traitements	% d'inhibition parasitaire (\pm SEM)			
	<i>P. chabaudi chabaudi</i>		<i>P. berghei ANKA</i>	
	J10	J5	J7	J8
CQ	100	100	100	100
<i>Desmodium velutinum</i>	31 \pm 4,4	10 \pm 1	-	-
<i>Rourea minor</i>	13 \pm 1,7	7 \pm 0,7	-	-
<i>Terminalia albida</i> Dubréka	56 \pm 0,6	100	89 \pm 0,3	61 \pm 1
<i>Terminalia albida</i> Kankan	14 \pm 1,4	63 \pm 0,7	35 \pm 0,4	19 \pm 1,27

SEM = Standard Error of Mean

Concernant l'effet des extraits de plantes sur la survie des souris, nous n'avons enregistré aucune perte dans le modèle à *Pcc* malgré un pic parasitaire observé à J10 (**Figure 22c** et **Figure 23c**), ce qui suggère que les plantes sont dépourvues de toxicité pour ce modèle. Cependant, en ce qui concerne l'infection à *PbA*, la mortalité des souris non traitées et des souris traitées avec *D. velutinum* et *R. minor* était de 98% à J6 (**Figure 22d**). De plus, à J9, 5 souris sur 6 étaient mortes dans le lot des souris traitées avec *T. albida* Kankan, tandis que le traitement avec *T. albida* Dubréka a empêché cette mortalité prématurée (**Figure 23d**). C'est seulement à partir de J12 que 2 souris sur 6 sont mortes dans le groupe traité avec *T. albida* Dubréka. Malgré que les souris traitées avec *T. albida* Dubréka aient développé une parasitémie, la survie a été maintenue à 50% jusqu'à J20 et aucun symptôme neurologique n'a été observé.

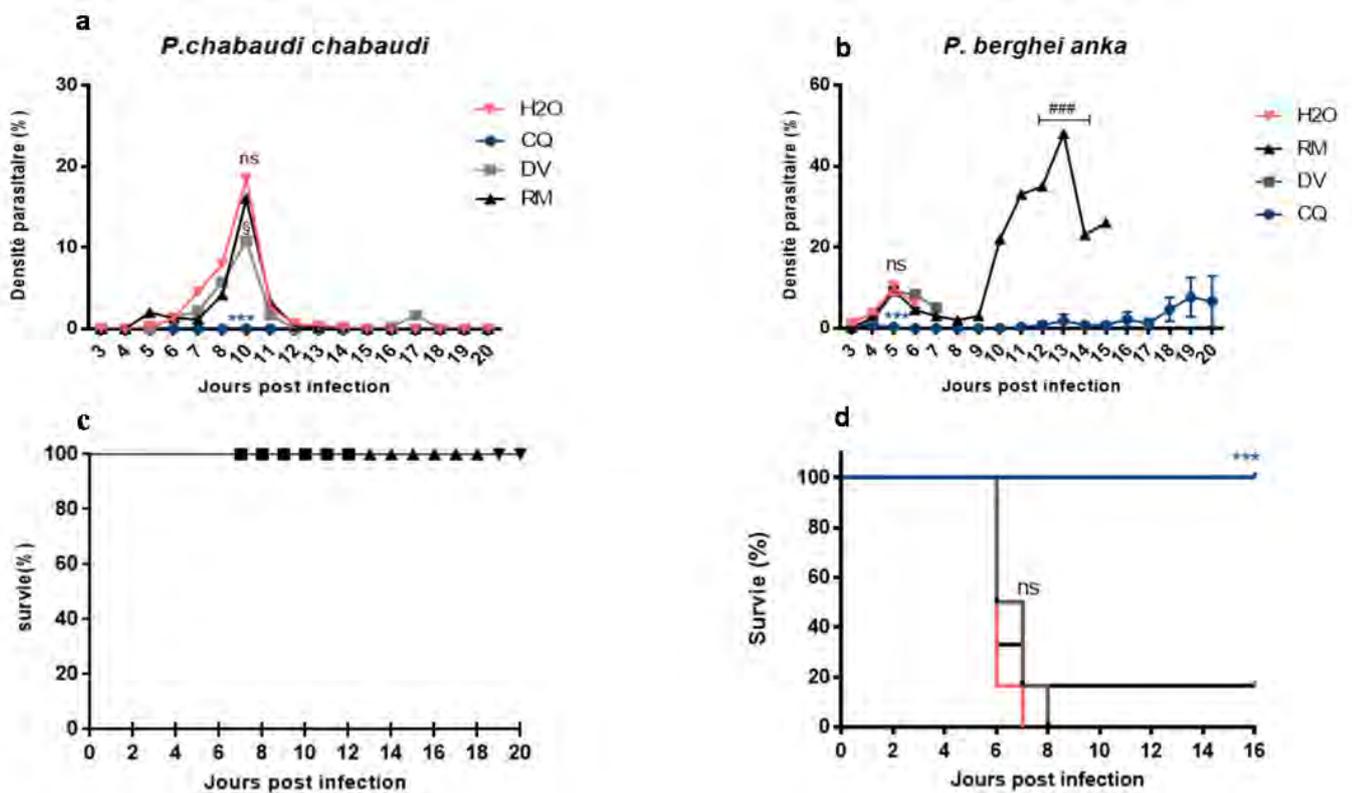


Figure 22 : Effet des extraits dichlorométhane de *Desmodium velutinum* et *Rourea minor* dans l'infection à *P. berghei ANKA* et *P. chabaudi chabaudi*. Les souris C57BL/6 infectées avec 10^6 globules rouges parasités ont été traitées après 2 heures d'infection avec l'extrait de *D. velutinum* (Dv, 50 mg/kg), de *R. minor* (Rm, 60 mg/kg), avec de la chloroquine (CQ, 5 mg/kg) ou de l'eau (H2O, 25 mg/kg) pendant 4 jours (J0 à J3). La densité parasitaire (a, b) et la survie (c, d) ont été les paramètres étudiés. *** $P < 0,0005$ pour la comparaison CQ vs H2O, § $P < 0,05$ pour la comparaison DV vs H2O, ### $P < 0,0005$ pour la comparaison RM vs CQ ; ns : non significatif.

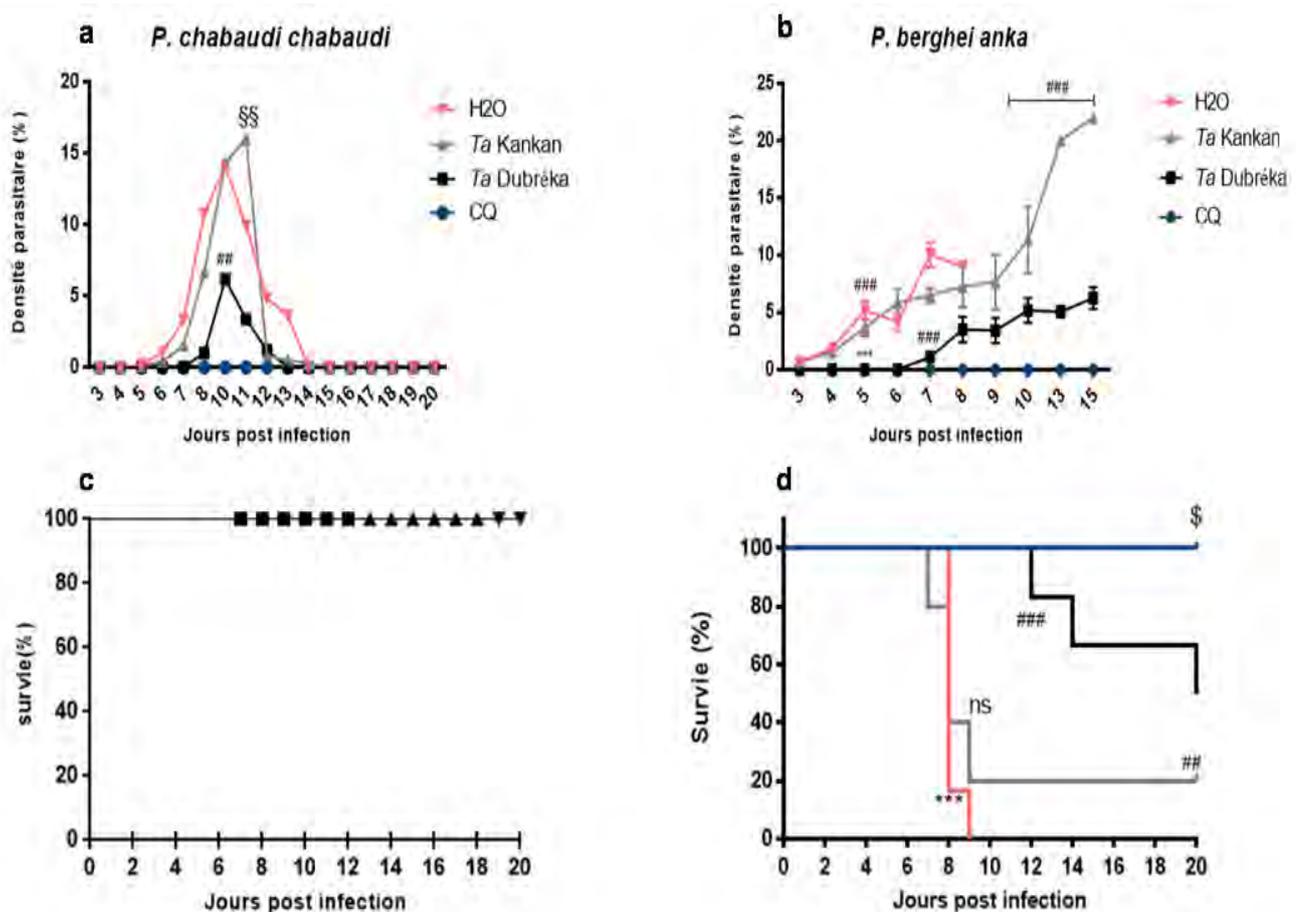


Figure 23 : Effet des extraits méthanoliques de *Terminalia albida* en provenance de Kankan et Dubréka dans l’infection à *P. berghei ANKA* et *P. chabaudi chabaudi*. Des souris C57BL/6 ont été traitées avec 100 mg/kg d’écorce de tige de *T. albida* (*Ta Kankan* ou *Ta Dubréka*), 5 mg/kg de chloroquine (CQ), ou 25 mg/kg d’eau 2 heures après leur infection avec 10^6 globules rouges parasités, selon le test suppressif de 4 jours. La densité parasitaire (a, b) et la survie (c, d) ont été les paramètres étudiés. *** $P < 0,0005$ pour la comparaison *Ta Dubréka* vs H2O ; §§ $P < 0,005$ pour la comparaison *Ta Kankan* vs H2O ; ### $P < 0,0005$ pour la comparaison *T. albida* Dubréka vs *T. albida* Kankan ; \$ $P < 0,05$ pour la comparaison CQ vs *Ta Dubréka* ; ns : non significatif.

3.3. Effet des extraits de plantes sur le poids des souris infectées avec *Pcc* et *Pba*

Pour évaluer l’impact des extraits sur le poids des souris infectées, nous avons calculé la différence de poids entre J0 et jours post-infection (Tableau 6). Dans le modèle à *Pcc*, toutes les souris ont gagné du poids à J12 et la différence a été très significative dans le groupe traité avec *D. velutinum* comparé au groupe non traité (*Dv* vs H2O, $P < 0,005$). Cependant, à J20, le

groupe *Dv* a légèrement perdu tandis que le poids des souris traitées avec *TaD* était plus élevé. En outre, cette amélioration de poids des souris *TaD* était légèrement supérieure au groupe traité avec la chloroquine (**Tableau 6**).

En revanche, dans le modèle *PbA*, la perte de poids a été observée dans tous les groupes de traitement. Contrairement à l'infection à *P. chabaudi*, les groupes traités avec *D. velutinum* et *R. minor* ont perdu plus de poids que le groupe non traité à J5 (**Tableau 6**). De plus, à J7, le traitement des souris avec les deux *Terminalia* a montré un effet bénéfique en limitant la perte de poids de manière similaire à la chloroquine (**Tableau 6**).

Tableau 6 : Effet des extraits sur le poids des souris C57BL/6 infectées avec *P. chabaudi chabaudi* ou *P. berghei anka*.

Souches	Traitement	n	J12-J0 ± SEM	n	J20-J0 ± SEM
<i>P. chabaudi chabaudi</i>	H2O	6	-0,61 ± 0,62	6	1,83 ± 0,34
	CQ	6	1,25 ± 0,16 *	6	2,14 ± 0,26 ns
	<i>D. velutinum</i>	6	1,82 ± 0,31 §§	6	1,27 ± 0,21 ns
	<i>R. minor</i>	6	1,08 ± 0,29 #	6	1,96 ± 0,18 ns
	<i>Ta</i> Dubréka	6	1,39 ± 0,36 *	6	2,53 ± 0,33 #
	<i>Ta</i> Kankan	6	0,51 ± 0,56	6	0,80 ± 0,58
	Traitement	n	J5-J0 ± SEM	n	J7-J0 ± SEM
<i>P. berghei ANKA</i>	H2O	6	-0,92 ± 0,24	6	-1,24 ± 0,19 *
	CQ	6	-0,73 ± 0,15	6	-0,87 ± 0,16
	<i>D. velutinum</i>	6	-1,45 ± 0,37	6	-
	<i>R. minor</i>	6	-1,46 ± 0,37	6	-
	<i>Ta</i> Dubréka	6	-	6	-0,77 ± 0,16
	<i>Ta</i> Kankan	6	-	6	-0,98 ± 0,76

* P < 0,05 CQ vs H2O ; §§ P < 0,005 *D velutinum* vs H2O ; # P < 0,05 *R minor* vs H2O ; # P < 0,05 *T. albida* Dubréka vs *T. albida* Kankan.

4. Discussion

Dans cette étude, l'activité *in vitro* trouvée contre la souche chloroquino-résistante pour l'extrait dichlorométhane des feuilles de *D. velutinum* ($IC_{50} = 14,4 \mu\text{g/ml}$), des écorces de tiges *R. minor* ($IC_{50} = 28,2 \mu\text{g/ml}$) et pour l'extrait méthanolique des écorces de tige de *T. albida* Kankan/Dubréka ($IC_{50} = 8,5 \mu\text{g/ml}$ et $1,5 \mu\text{g/ml}$, respectivement) sont inférieures à celles rapportées par l'IRDPMAG qui a indiqué une très bonne activité de ces extraits avec des IC_{50} de $0,6 \mu\text{g/ml}$ pour *T. albida* (Traore et al., 2014), $0,4 \mu\text{g/ml}$ pour *R. minor* et $0,25 \mu\text{g/ml}$ pour *D. velutinum* (données non publiées). De même, l'équipe de M. Traoré-Coulibaly a rapporté que l'extrait dichlorométhane des feuilles de *D. velutinum* présentait une activité prometteuse contre *PfK1* avec une IC_{50} de $9 \mu\text{g/ml}$ (Traore-Coulibaly et al., 2013). Le fractionnement bioguidé réalisé sur les tiges de *R. minor* a montré une bonne activité de l'extrait chloroformique avec une IC_{50} de $5 \mu\text{g/ml}$ contre D6 (chloroquino-sensible) et de $2 \mu\text{g/ml}$ contre W2 (chloroquino-résistante) (He et al., 2006). Ces différences de résultats au niveau des extraits pourraient s'expliquer par plusieurs paramètres, entre autres la disparité des souches parasitaires testées, les méthodes d'extraction, de séchage, les lieux et périodes de récolte qui sont des paramètres pouvant influencer les constituants chimiques des plantes. Ce dernier paramètre lié au lieu de récolte est renforcé par nos résultats obtenus à partir de *T. albida* prélevé dans deux régions différentes de Guinée.

Pour les tests *in vivo*, l'effet thérapeutique des extraits a été évalué sur deux modèles de paludisme avec les souches expérimentales *P. chabaudi* pour le paludisme simple et *P. berghei ANKA* pour le paludisme cérébral. Tous les extraits ont été dissous dans de l'eau distillée pour être administrés aux souris. Le mode d'administration choisi a été le gavage, pour essayer d'être au plus près des conditions du tradithérapeute. Les différents dosages ont été obtenus par détermination du résidu sec de la dose utilisée en médecine traditionnelle. Dans le modèle à *P. chabaudi*, l'effet des extraits de *D. velutinum* et *R. minor* sur les poids des souris était positif. La différence de poids entre les groupes traités et non traité a été très significative pendant la phase aigüe de l'infection ($P < 0,005$ Dv vs H₂O, $P < 0,05$ pour les deux autres plantes vs H₂O). Ces résultats suggèrent que ces plantes pourraient contenir des substances efficaces pour prévenir les carences en nutriment. Il a été rapporté que certaines espèces de *Desmodium* sont utilisées en médecine traditionnelle dans le traitement de la malnutrition infantile (Ma et al., 2011). Etant donné que la malnutrition est associée à une morbidité et mortalité plus élevées dans l'infection palustre (Shankar, 2000), l'apport nutritionnel dans le traitement du paludisme pourrait réduire l'affection de la maladie.

Concernant la parasitémie, les souris infectées par *P. chabaudi* et traitées avec *R. minor* ont développé une parasitémie à partir de J5 tandis que les souris traitées avec *D. velutinum* ont initié une parasitémie à J6 (**Figure 22a**). De même, à J10, l'extrait dichlorométhane des feuilles de *D. velutinum* a montré une inhibition non négligeable de la densité parasitaire (31%) tandis que le groupe traité avec l'eau avait atteint son pic parasitaire caractéristique de l'infection ($P < 0,05$ *Dv* vs H₂O). La densité parasitaire du groupe traité avec l'extrait dichlorométhane des écorces de tige de *R. minor* était similaire au groupe non traité (**Figure 22a**). Ce résultat indique que *R. minor* utilisé dans cette étude n'a pas d'effet contre *P. chabaudi* dans ce modèle. En revanche, le traitement par *D. velutinum* à la dose de 50 mg/kg, a montré une certaine activité antiparasitaire (31%). Ce résultat constitue le premier rapport indiquant l'effet antiplasmodial *in vivo* de *D. velutinum* dans le modèle d'infection à *P. chabaudi*.

Par ailleurs, le paludisme s'accompagne de processus inflammatoires et oxydatifs induit par le parasite, et l'état fébrile est le premier signe clinique suite à l'éclatement successif des érythrocytes parasités (Bartoloni and Zammarchi, 2012). A cet égard, *D. velutinum* appartenant à la famille des *Fabaceae* pourrait être une plante intéressante. En effet, les propriétés antipyrétiques et anti-inflammatoires de cette plante sont connues (Fred et al. 2012 ; Fred-Jaiyesimi and Ogunlana, 2016). L'effet anti-inflammatoire de l'extrait hexanique a été rapporté chez des souris présentant un œdème, par inhibition de la production de prostaglandines, ce qui pourrait être dû aux composés apolaires de la plante (Fred-Jaiyesimi and Oluwaseun Ogunlana, 2016). Ces résultats combinés aux nôtres renforcent l'intérêt de *D. velutinum* pour le traitement du paludisme non léthal et supportent en partie son utilisation traditionnelle.

Dans le modèle de paludisme grave (*P. berghei ANKA*), *D. velutinum* et *R. minor* ont présenté un faible effet dans l'amélioration des paramètres mesurés, notamment le poids (Tableau 6), la survie (**Figure 22d**) et la parasitémie (**Tableau 5**). La durée de vie des souris traitées avec les deux extraits était similaire au groupe non traité, ce qui indique que ces deux plantes sont inactives dans ce modèle. En effet, dans l'infection à *P. berghei ANKA*, la mortalité prématurée n'est pas associée à une hyperparasitémie mais à une immunopathologie qui favorise l'accumulation des cellules immunitaires dans le cerveau et le dysfonctionnement de l'organe (Basir et al., 2012; Hearn et al., 2000; Lou et al., 2001). Les résultats délétères observés chez les souris traitées avec *D. velutinum* et *R. minor* pourraient être dus en partie à la nature de leur extrait car la majeure partie des travaux rapportés indique l'activité des extraits polaires dans ce modèle de paludisme (Muganga et al. 2014; Omonkhua et al. 2013; Haidara et al. 2018).

Pour *T. albida*, nous avons étudié deux extraits provenant de deux endroits différents de Guinée, que nous avons nommés *TaD* pour *T. albida* de Dubréka et *TaK* pour *T. albida* de Kankan. L'infection à *P. chabaudi*, se manifeste par une perte de poids, une hyperparasitémie ainsi qu'une anémie chez les souris sensibles suivie d'une phase chronique associée à une guérison spontanée. Comme l'illustre le tableau 6, le poids des souris traitées avec les deux échantillons de *T. albida* était supérieur au poids des souris non traitées avec une différence significative dans le groupe *TaD* ($P < 0,05$ *TaD* vs H_2O). En accord avec ce résultat, l'espèce *macroptera* a également amélioré le poids des souris infectées par *P. chabaudi* pendant la phase aiguë de l'infection (Haidara et al., 2018). Ces résultats suggèrent que le genre *Terminalia* présente des propriétés communes permettant d'améliorer les signes cliniques au cours de la phase aiguë de l'infection à *P. chabaudi*. De plus, le traitement avec *TaD* a permis un contrôle partiel de l'infection avec une réduction parasitaire de 56% indiquant une bonne activité de l'extrait (Muñoz et al., 2000). En revanche, les souris traitées avec *TaK* ont montré une densité parasitaire similaire au groupe non traité. Etant donné que l'écosystème est l'un des facteurs déterminant dans la composition chimique du végétal (Conforti et al., 2011; Harborne, 2001), la différence des lieux de récolte pourrait expliquer cette différence d'activités.

Dans le modèle d'infection à *P. berghei ANKA*, toutes les souris traitées avec l'extrait méthanolique des écorces de tige de *TaD* et *TaK* ont perdu moins de poids que les souris du lot non traité (**Tableau 6**). De plus, la perte de poids chez les souris traitées avec les deux extraits était similaire aux souris du groupe traité avec la chloroquine, molécule de référence dans notre étude. Cette perte de poids a été également signalée chez les souris traitées avec *T. macroptera* à J9 de l'infection (Haidara et al., 2018). La comparaison de la parasitémie à J5 montre que les souris traitées avec *TaD* étaient encore négatives à l'infection alors que le groupe ayant reçu *TaK* étaient faiblement positives avec une inhibition de 63% (**Tableau 5** et **Figure 23b**). Ce résultat indique une bonne activité des extraits. Cependant, l'effet thérapeutique de *TaK* s'atténue à partir de J7 avec une parasitémie similaire au groupe non traité. Ce phénomène a été associé à une mortalité de 83% des souris ayant reçu *TaK*. Dans le groupe des souris traitées avec *TaD*, une légère parasitémie apparaît à partir de J7 avec une inhibition de 89% comparée au lot non traité. Le traitement avec *TaD* a également permis d'éviter la mort prématurée des souris jusqu'à J12 et a permis de maintenir un taux de survie de 50% jusqu'à J20 (**Figure 23d**). Ces résultats mettent en évidence pour la première fois l'activité antiplasmodiale de *T. albida* dans les modèles de paludisme simple et sévère. Plusieurs études ont déjà souligné le potentiel thérapeutique du genre *Terminalia* dans le traitement du paludisme. L'acide ellagique et l'acide

gallique, présents dans leur composition chimique, ont largement été décrits pour leur activité antiplasmodiale (Ndjonka et al. 2012; Njomnang Soh et al. 2012; Muganga et al. 2014). Ainsi, l'activité anti-inflammatoire, antioxydante et immunomodulatrice de ces composés phénoliques (Abiodun et al., 2016; Tanaka et al., 2018) constitue un avantage dans le traitement du paludisme sévère. Cependant, de telles activités n'ont pas été démontrées *in vivo*. Par ailleurs, il serait intéressant de déterminer la composition chimique des deux échantillons de *Terminalia* afin de comprendre la différence significative des effets observés.

5. Conclusion

Les résultats de ces premiers travaux indiquent que l'extrait dichlorométhane des écorces de tige de *R. minor* n'a pas d'effet *in vivo* dans les modèles murins de paludisme à *P. chabaudi* et *P. berghei ANKA*. Notre étude n'a donc pas permis de valider l'usage traditionnel de cette plante contre le paludisme, bien que le type d'extrait utilisé dans notre étude ne corresponde pas à la préparation traditionnelle du tradithérapeute.

Pour *D. velutinum*, bien qu'il ait montré une certaine activité dans le modèle à *P. chabaudi*, son usage ne peut être recommandé dans le traitement curatif de l'infection. Etant donné que les préparations traditionnelles sont composées généralement d'une association de plantes jouant différents rôles, l'utilisation large de *D. velutinum* pourrait se justifier par ces propriétés antipyrétiques dans le traitement du paludisme.

T. albida récoltée à Dubréka a montré un potentiel antipaludique très intéressant dans les deux modèles de paludisme expérimentaux utilisés dans notre étude. Pour aller plus et tenter de comprendre les mécanismes d'action de *T. albida* dans le modèle à *P. berghei ANKA*, le prochain chapitre porte sur l'étude des propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes de la plante. De plus, la différence d'activités observée entre *Terminalia* Dubréka et Kankan pourrait se justifier par leur composition en métabolites secondaires. Pour confirmer cela, nous avons mené une étude comparative des deux extraits par une approche déréplicative (HPLC-UV-MSn). Ces résultats sont présentés dans le chapitre 3. Enfin, le chapitre 4 confirmera l'identification botanique des deux plantes prélevées à Dubréka et Kankan.

Chapitre 2 : Etude de l'activité antipaludique et immunomodulatrice de *T. albida* Dubréka

1. Introduction

Comme toutes maladies infectieuses, *P. falciparum* induit chez son hôte une activation du système immunitaire, différente selon le niveau de sensibilité à l'infection. La forme grave touche principalement les patients naïfs dont l'immunité antipalustre est faible ou inexistante. Elle se caractérise par la liaison des érythrocytes parasités à l'endothélium vasculaire des organes profonds, créant des micro-thromboses dans les capillaires (Gay et al., 2012; Storm and Craig, 2014). Cette interaction repose sur la protubérance créée à la surface des globules rouges parasités, les Knobs, qui contiennent des protéines parasitaires telles que *P. falciparum erythrocyte membrane protein 1* (PfEMP1) qui interagit avec les molécules d'adhésion de l'endothélium (Lennartz et al., 2017; Maier et al., 2009). Bien que ce phénomène soit avantageux pour le parasite, il entraîne chez l'hôte une baisse du flux sanguin qui, dans le cas d'un neuropaludisme, conduit à réponse inflammatoire très importante et néfaste pour les neurones, une hypoxie cérébrale, une encéphalite, un coma et la mort (Bruneel, 2019; Dunst et al., 2017; Storm and Craig, 2014). Dans ce contexte, la stimulation des phagocytes favorise la production d'espèces réactive de l'oxygène (ROS) entraînant un environnement pro-oxydant corrélé au développement de la forme grave (Becker et al., 2004; Percário et al., 2012).

L'infection à *Plasmodium berghei ANKA* chez les souris C57BL/6 représente un modèle expérimental approprié à l'étude du neuropaludisme en raison de ses nombreuses caractéristiques communes avec le neuropaludisme humain. Bien qu'il ne reproduise pas exactement tous les événements de la maladie humaine, il constitue un moyen incontournable dans l'évaluation d'un candidat médicament pour le traitement de l'infection palustre (Combes et al., 2005; Lou et al., 2001).

Pour comprendre les effets de *T. albida* sur les réponses inflammatoire et oxydante délétères au cours d'un neuropaludisme, nous avons étudié la modulation de la réponse inflammatoire par *T. albida* dans le modèle à *P. berghei ANKA*, ainsi qu'*in vitro* dans un modèle non palustre. Pour la réponse oxydante nous avons mesuré la capacité de la plante à neutraliser les ROS *in vitro*.

2. Matériel et méthodes

2.1. Toxicité aiguë

Une étude de toxicité aiguë de l'extrait de *T. albida* a été réalisée pour déterminer la dose létale médiane DL50 de l'extrait. Les souris ont été divisées en deux groupes de trois souris et traitées par voie orale avec une dose unique de *T. albida* de 2 000 mg/kg ou d'eau (20 mL/kg), d'après le test limite proposé par l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) (OECD, 2008). Les animaux ont été observés pendant les 4 premières heures après le traitement pour enregistrer les décès immédiats, et une fois par jour pendant 20 jours pour enregistrer les décès et les changements de comportement. Pour évaluer l'effet du traitement par *T. albida* sur le poids corporel, le poids a été relevé à J7, J14 et J20 et comparé à J0 pour les deux groupes (*T. albida* et eau).

2.2. Activité antiplasmodiale *in vivo*

Les souris ont été infectées par *P. berghei* ANKA et traitées selon la méthode décrite précédemment (chapitre 1). L'apparition des symptômes neurologiques a été mesurée en évaluant quotidiennement dix paramètres neurologiques permettant de calculer un score neurologique, le « rapid murine cerebral behaviour scale » (RMCBS) entre J3 et J7 selon la méthode décrite par Carroll *et al.* (Carroll *et al.*, 2010). A J8, toutes les souris ont été sacrifiées en raison des symptômes caractéristiques (froissement du front, perte de mobilité, prostration) apparus dans le groupe non traité. Les cerveaux ont été prélevés pour les analyses cellulaires et moléculaires.

2.3. Mise en évidence des populations cellulaires par cytométrie en flux

Pour évaluer l'effet de *T. albida* sur le recrutement de la population lymphocytaire, les cerveaux des souris (3 souris/groupe) traitées ou non ont été prélevés à J7 et broyés entre deux lames de verre dans du PBS. La suspension a été filtrée (100 microns) et versée délicatement sur un gradient de Lymphoprep (Alere Technologies AS, Oslo, Norvège) afin de séparer les leucocytes. Pour identifier les populations de cellules T, 200 µl de suspension leucocytaire ont été utilisés pour procéder au marquage par des anticorps couplés à des fluorochromes (Miltenyi Biotec, France). Les cellules ont été lavées, marquées avec les anticorps suivants : CD3-PE (lymphocytes), CD4-VioBright FITC (lymphocytes T CD4), CD8-VioGreen (lymphocytes T CD8), LD- Violet (cellules mortes). Un tube témoin non marqué a été préparé. Les marquages

ont été réalisés à l'obscurité pendant 20 min à température ambiante suivi d'une fixation au paraformaldehyde à 4% et maintenues 15 min à l'obscurité à température ambiante. Les cellules ont été ensuite lavées, centrifugées pendant 10 min à 1500 rpm puis remises en suspension dans 300 µl de PBS contenant 1% de sérum de veau fœtal (SVF) et conservées à 4°C en attendant la lecture. L'analyse a été effectuée sur un cytomètre LSR Fortessa (BD Bio-sciences) à l'aide du logiciel FACSDiva™. Les populations cellulaires ont été estimées dans les cellules vivantes par discrimination des cellules mortes marquées au Live-Dead.

2.4. Expression génique de marqueurs pro- et anti-inflammatoires dans le cerveau des souris

Pour mesurer l'effet du traitement sur la réponse inflammatoire chez les souris infectées par *P. berghei*, les souris ont été divisées en trois groupes de 6 souris, infectées puis traitées avec l'extrait brut de *T. albida*, la chloroquine ou l'eau distillée comme précédemment. Les souris ont été sacrifiées 7 ou 8 jours après l'infection (J7 ou J8). Les cerveaux de souris ont été disséqués et divisés longitudinalement en deux parties égales pour être utilisés dans les expériences de RT-qPCR et d'ELISA. Une moitié de cerveau a été placée dans des tubes (MP Biomedicals) contenant 650 µL de tampon de lyse RLT (provenant du kit EZ-10 Spin Column Total RNA Mini-preps Super Kit, Bio Basic), avant d'être écrasée dans un FastPrep®-24 (MP) et centrifugée pendant 10 minutes. L'ARNm a été préparé avec le kit « EZ-10 Spin Column Total RNA Minipreps Super Kit » (Bio Basic) selon le protocole du fabricant. La synthèse de l'ADNc a été réalisée selon les recommandations du fabricant (kit Verso, Thermo Scientific). La RT-qPCR a été effectué sur un LightCycler 480 en utilisant le LightCycler SYBR Green I Master Mix (Roche Diagnostics). Les amorces (Eurogentec) ont été conçues avec le logiciel Primer 3. La GAPDH a été utilisée comme gène de ménage. Pour la quantification relative, une gamme a été réalisée à partir du mix des échantillons testés et dilués en série. Les amorces utilisées sont listées dans le tableau 1 (voir article en anglais en annexe).

2.5. Niveaux de cytokines dans les cerveaux des souris

L'autre moitié du cerveau a été écrasée entre deux lames de verre dans du PBS puis filtrée à travers un filtre stérile de 100 microns. Après centrifugation (1 min à 10 000 g et à température ambiante), le culot a été homogénéisé dans 5 mL d'IGEPAL, une solution inhibitrice de protéase, et conservé à -80 °C jusqu'à son utilisation. Les taux d'IL-6, de TNF, d'IL-1β et d'IL-

10 ont été déterminés par dosage immuno-enzymatique (ELISA) à l'aide des kits murins OptiEIA (BD Biosciences), conformément aux instructions du fabricant.

2.6. Expression génique de marqueurs pro- et anti-inflammatoires par des macrophages murins après activation *in vitro* au LPS / IFN γ

Les macrophages péritonéaux de souris ont été prélevés par rinçage de la cavité péritonéale avec 5 ml de NaCl à 0,9%. Après centrifugation, les cellules ont été mise en suspension dans du milieu Eagle (InVitrogen) enrichi en glutamine, pénicilline, streptomycine et sérum de veau fœtal 5%. Les cellules (5,10⁵/puits) ont été incubées pendant 2 heures à 37 °C et 5 % de CO₂, puis les cellules non adhérentes ont été éliminées par lavage avec du PBS. Les macrophages adhérents ont été stimulés avec 10 ng/mL de lipopolysaccharide (LPS) et 40 UI/mL IFN γ (Clinisciences) pendant 2 heures. Après stimulation, les cellules ont été lavées et traitées avec 10 μ g/mL d'extrait brut de *T. albida* dilué dans le milieu ou avec le milieu seul pendant 4 heures à 37°C et 5% de CO₂. La dose de 10 μ g/mL a déjà été déterminée par un test de LDH montrant que cette concentration n'est pas toxique pour les macrophages péritonéaux de souris (**Figure 23**). Après extraction de l'ARNm et synthèse de l'ADNc, le niveau d'expression des marqueurs a été évalué par RT-qPCR. Les amorces utilisées sont listées dans le **tableau 7**.

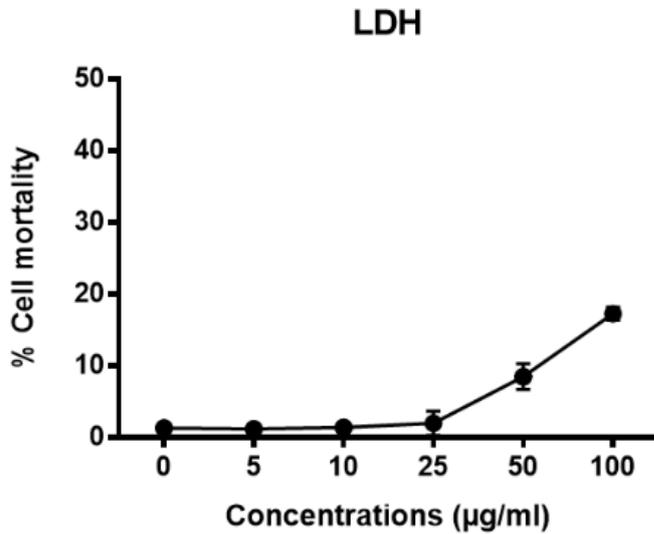


Figure 24 : Niveau de cytotoxicité de *Terminalia albida* vis-à-vis de macrophages péritonéaux murins sains par le test de la lactate déshydrogénase (LDH). Les cellules ($2 \cdot 10^5$ /puits) ont été laissées à adhérer pendant 2 heures à 37 °C et 5 % de CO₂, puis les cellules adhérentes ont été traitées avec des dilutions en série de l'extrait de *T. albida* (100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL) et incubées à 37 °C et 5 % CO₂ pendant 24 heures. Les puits contrôles ont été traités au triton (lyse totale, concentration maximum de LDH). La concentration de LDH relarguée dans le milieu a été déterminée à l'aide du Kit « Cytotoxicity detection Kit » (Roche, France). L'absorbance a été mesurée à 490 nm avec un compteur Wallac Victor 2 1420. La mortalité cellulaire a été calculée en pourcentage (absorbance des puits traités à l'extrait*100/absorbance des puits traités au triton).

Tableau 7 : Séquences d'amorces murines utilisées dans les expériences quantitatives de RT-qPCR.

Gène	Sens	Antisens	Taille du fragment (bp)
GAPDH	5'-ACA-CAT-TGG-GGG-TAG-GAA-CA	5'-AAC-TTT-GGC-ATT-GTG-GAA-GG	222
IL-1 β	5'-GAT-CCA-CAC-TCT-CCA-GCT-GCA	5'-CAA-CCA-ACA-AGT-GAT-ATT-CTC-GAT-G	151
TNF	5'-CTC-CCT-TTG-CAG-AAC-TCA-GG	5'-AGC-CCC-CAG-TCT-GTA-TCC-TT	211
HO-1	5'-CCA-GAG-TGT-TCA-TTC-GAG-CA	5'-CAC-GCA-TAT-ACC-CGC-TAC-CT	174
IL-12	5'-TGG-TTT-GAT-GAT-GTC-CCT-GA	5'-AGG-TCA-CAC-TGG-ACC-AAA-GG	172
IFN γ	5'-TGA-GCT-CAT-TGA-ATG-CTT-GG	5'-ACT-GGC-AAA-AGG-ATG-GTG-AC	236
CD11b	5'-AGA-TCG-TCT-TGG-GAG-ATG-CT	5'-GAC-TCA-GTC-AGC-CCC-ATC-AT	169
TLR $_2$	5'-TGT-AAC-GCA-ACA-GCT-TCA-GG	5'-TGC-TTT-CCT-GCT-GGA-GAT-TT	196
ICAM-1	5'-AGC-TTG-CAC-GAC-CCT-TCT-AA	5'-AGC-ACC-TCC-CCA-CCT-ACT-TT	159
GranzB	5'-GCT-TCA-CAT-TGA-CAT-TGC-GC	5'-AGA-ACA-GGA-GAA-GAC-CCA-GC	172
NF κ B	5'-ACC-GAA-GCA-GGA-GCT-ATC-AA	5'-GCG-TAC-ACA-TTC-TGG-GGA-GT	178
PGEs	5'-CAG-CCT-ATT-GTT-CAG-CGA-CA	5'-CCT-AGG-CTT-CAG-CCT-CAC-AC	157
TGF β	5'-GAC-TCT-CCA-CCT-GCA-AGA-CC	5'-ACG-CGG-GTG-ACC-TCT-TTA G	246
CD36	5'-GAG-CAA-CTG-GTG-GAT-GGT-TT	5'-GCA-GAA-TCA-AGG-GAG-AGC-AC	206
iNOS	5'-ACA-AGG-CCT-CCA-ATC-TCT-GC	5'-TCC-TGG-ACA-TTA-CGA-CCC-CT	95
VEGF	5'-GCT-GTA-ACG-ATG-AAG-CCC-TG	5'-CGC-TCC-AGG-ATT-TAA-ACC-GG	236
<i>P. berghei</i>	5'-TCA-TTG-GGC-TCT-CAA-AGG-GT	5'-CAA-TTG-GAG-GGC-AAG-TCT-GG	209

2.7. Niveaux de cytokines produites par les macrophages murins activés *in vitro* au LPS/IFN γ

Après la stimulation des macrophages péritonéaux au LPS/IFN γ (10 ng/mL LPS et 40 UI/mL IFN γ) comme précédemment, les cellules ont été traitées avec *T. albida* (10 μ g/mL) ou milieu seul pendant 24 heures à 37 °C et 5% CO₂. Chaque condition a été testée en triplicat. Les surnageants de culture ont ensuite été prélevés pour quantifier les cytokines (TNF, IL-1 β , IL-6 et IL-10) par ELISA en utilisant des kits murins OptiEIA (BD Biosciences), selon les instructions du fabricant.

2.8. Modèle *in vitro* de production de ROS et activité anti-oxydante de *Terminalia albida*

La capacité de *T. albida* à limiter la production de ROS dans les cellules cancéreuses de foie humaines HepG2, a été évaluée en utilisant le système cellulaire Light-Up (LUCS) selon la méthode décrite précédemment (Derick et al., 2017). Ces tests ont été réalisés par la société AOP (Antioxydant Power, Toulouse). Brièvement, l'extrait méthanolique de *T. albida* a été solubilisé en DMSO et neuf dilutions en série ont été préparées de 1,92 mg/mL à 0,0075 mg/mL. Les cellules HepG2 (75,000/puits) ont été cultivées pendant 24 heures en DMEM complété en SVF 10% et pénicilline-streptomycine 1% à 37°C et 5% CO₂. Les expériences ont été réalisées en DMEM sans SVF. Au moins deux expériences indépendantes ont été réalisées sur des plaques de 96 puits, chacune en triplicat. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 4 heures en présence ou non de concentrations croissantes d'extrait. Les cellules ont ensuite été incubées en présence du marqueur fluorescent thiazole orange à 4 μ M pendant une heure et la fluorescence a été mesurée à 535 nm (émission) pendant vingt irradiations récurrentes à 480 nm (excitation). L'indice d'antioxydant (IA) a été calculé à partir de la cinétique en utilisant la formule $AI = 100 - 100 (0,12 \text{ RFU}_{\text{un sample}} / 0,12 \text{ RFU}_{\text{un control}})$. Les courbes dose-réponse ont été obtenues en combinant l'AI en fonction du log (10) de la concentration de l'échantillon et traitées par ajustement sigmoïde selon l'équation $AI = A_{\text{min}} + (A_{\text{max}} - A_{\text{min}}) / (1 + 10(\text{Log}(\text{EC50-CE}) * HS))$ pour déterminer la valeur EC50.

2.9. Analyse UHPLC-HRMS

Le profil des métabolites de l'extrait méthanolique de *T. albida*, l'analyse des données et l'analyse statistique ont été réalisés comme décrit précédemment (Haidara et al., 2018). Cette méthode sera décrite en détail dans le chapitre 3 suivant.

2.10. Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes \pm erreur standard et analysés avec le logiciel Graph Pad Prism version 6. Les comparaisons ont été effectuées au moyen d'une analyse de variance à sens unique (ANOVA) suivie de la méthode de comparaison multiple des moyennes de Bonferroni-Dunnnett. Le test t et le test U de Mann-Whitney ont été utilisés pour les comparaisons deux à deux. Les différences étaient considérées comme significatives si $P < 0,05$.

3. **Résultats et discussion**

L'administration de 2 000 mg/kg d'extrait méthanolique d'écorce de tige de *Terminalia albida* n'a induit aucun changement d'attitude chez les souris, ni de perte de poids comme le montre la **figure 24**. Aucun décès n'a été enregistré au cours de la période d'observation de 20 jours. Ce résultat va dans le sens de nombreux rapports qui ont décrit l'absence de toxicité du genre *Terminalia* (Haidara et al., 2018; Jayesh et al., 2017).

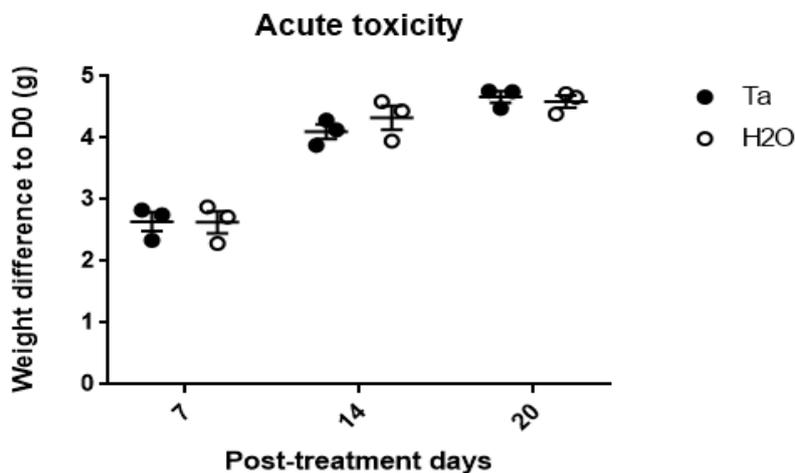


Figure 25 : Test de toxicité aigüe *in vivo* : effet de *Terminalia albida* sur le poids des souris

L'analyse des scores neurologiques entre les groupes a montré que les souris infectées par *P. berghei ANKA* non traitées ont développé une paralysie progressive, une perte de force des membres, des poils ébouriffés, une ataxie et un coma entre J5 et J7. Bien que les souris traitées avec *Terminalia albida* présentaient une légère altération des fonctions cérébrales à J6 et J7, il

n'y avait pas de différence significative entre les scores des souris traitées par CQ et *Terminalia* à J6 et J7 (**Figure 26**).

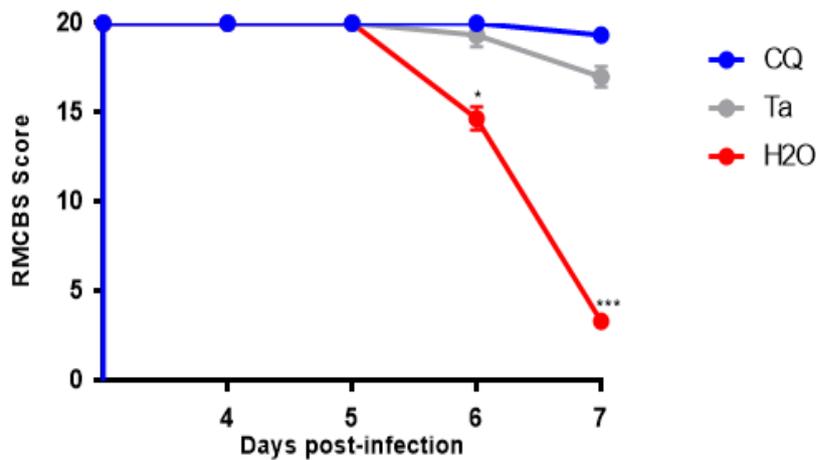


Figure 26 : Rapid Murine Cerebral Behaviour Scale (RMCBS) : effet de *Terminalia albida* sur les fonctions cérébrales des souris infectées par *P. berghei ANKA*.

Dans cette étude, nous avons montré que le traitement avec *T. albida* réduit de façon significative l'infiltration de la population lymphocytaire notamment les lymphocytes T CD8 dans le cerveau des souris infectées par *P. berghei ANKA* (**Figure 27**). Or, ces cellules sont associées au développement du paludisme cérébral en raison de leur capacité à produire des substances cytotoxiques et neurodégénératrices telles que la perforine et le granzyme B suite à leur interaction avec les cellules de l'endothélium vasculaires présentant des antigènes parasitaires (Howland et al., 2015).

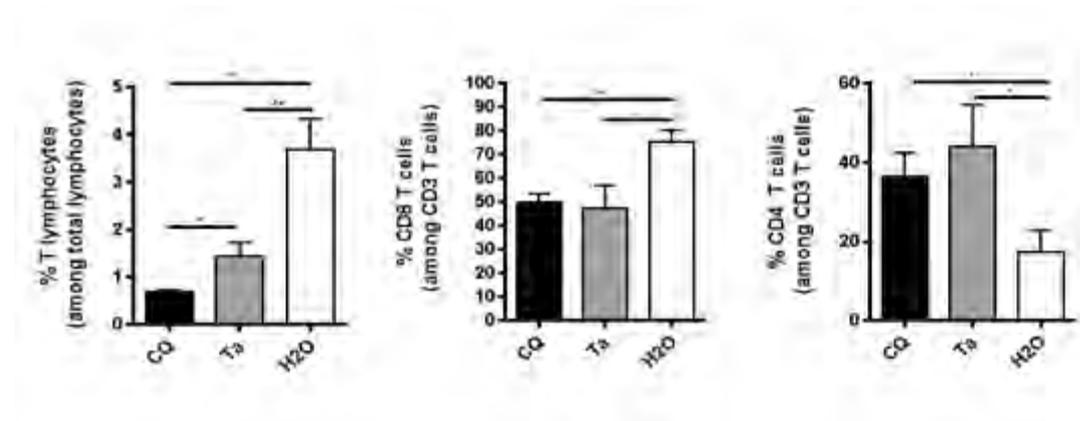


Figure 27 : Effet de *Terminalia albida* sur l’infiltration cellulaire dans les cerveaux de souris infectées par *P. berghei* ANKA.

Par ailleurs, l'infection à *Pba* est également caractérisée par une production importante de médiateurs pro-inflammatoires qui favorisent la pathogenèse du paludisme cérébral. Dans notre étude, la quantification des gènes par RT-qPCR dans le cerveau des souris infectées et traitées ou non, nous a permis de noter une baisse significative de l'expression d'IFN γ , de granzyme B, d'ICAM-1 et de CD11b dans le cerveau des souris traitées avec *T. albida* ou la chloroquine, en comparaison aux souris non traitées (**Figure 28**). Le rôle central de ces médiateurs dans la pathogenèse du paludisme cérébral est connu. L'IFN γ produit notamment par les cellules T CD4 de type 1 est essentiel pour le contrôle précoce du parasite et la synthèse d'autres cytokines. Toutefois, il faut également noter que l'expression marquée d'IFN γ est un corrélat du paludisme cérébral (Claser et al., 2011; King and Lamb, 2015). Dans des conditions immunopathologiques, l'IFN γ régule à la hausse la production de molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM, P-Selectine) sur les cellules endothéliales et stimule d'autres cellules immunitaires pour la production de cytokine et chimiokines essentielles à la séquestration accrue des globules rouges parasités et de leucocytes dans les micro-vaisseaux cérébraux (Claser et al., 2011; Lou et al., 2001; Villegas-Mendez et al., 2012, 2017).

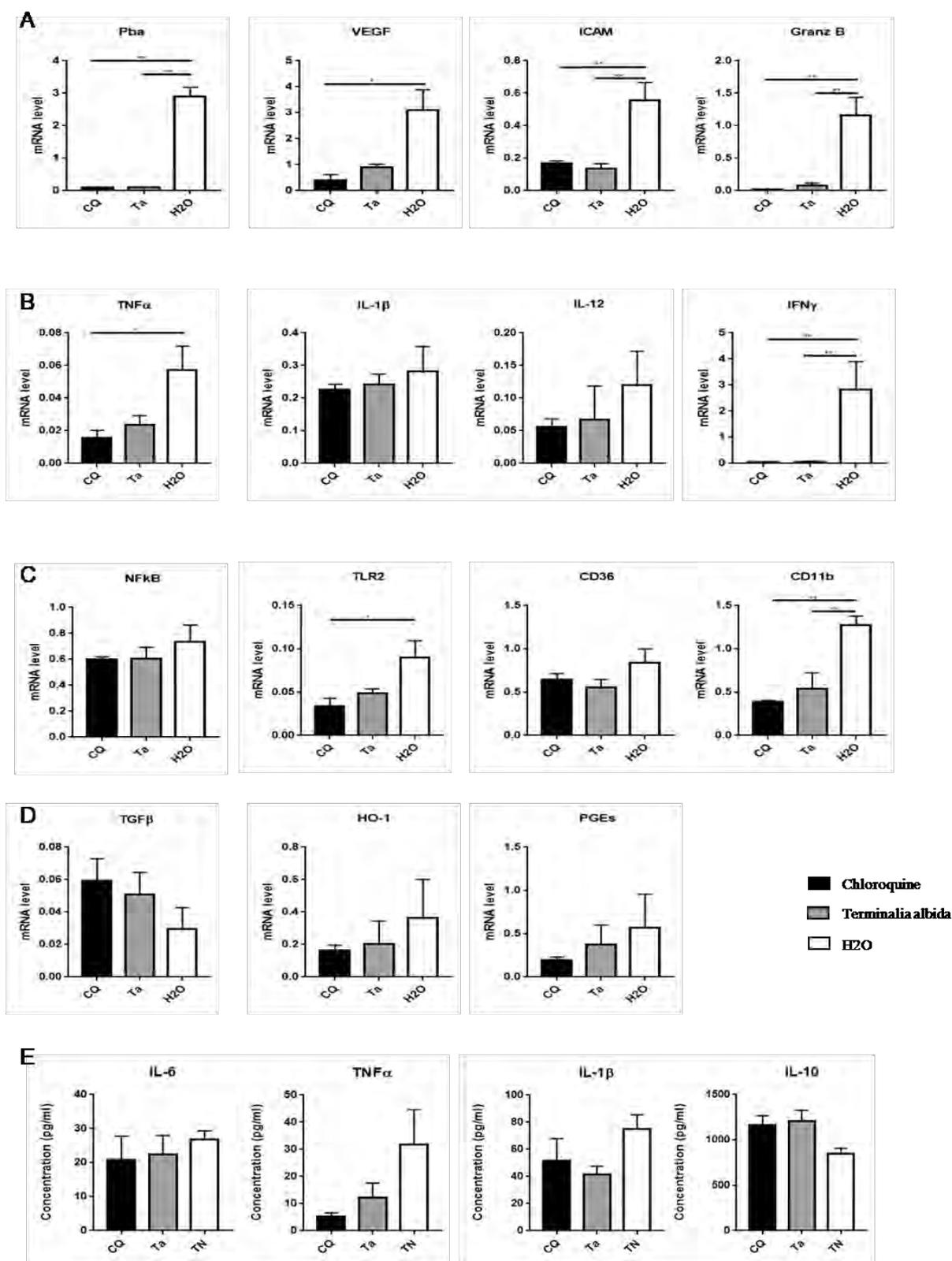


Figure 28 : Effet de *Terminalia albida* sur l'expression de marqueurs pro- et anti-inflammatoires dans les cerveaux de souris infectées par *P. berghei* ANKA.

La production de Granzyme B est associée à la dégénérescence neuronale et à la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (Eeka and Phanithi, 2018). Au cours du paludisme cérébral, les cellules T CD8 migrent vers le cerveau et interagissent avec les cellules endothéliales qui présentent des antigènes parasitaires via le CMH 1. Ces cellules endothéliales impliquées dans la présentation du pathogène sont détruites par les lymphocytes T CD8 cytotoxiques *via* la production de Granzyme B et perforine. Ainsi, leur destruction favorise la migration des cellules immunitaires et débris parasitaires dans le parenchyme cérébral et conduit à la dégénérescence neuronale (Haque et al., 2011; Howland et al., 2015; Poh and Rénia, 2015; Poh et al., 2014). De plus, l'augmentation de l'expression de CD11b sur les monocytes/macrophages a été associée au paludisme cérébral chez les souris C57BL/6 (Cahayani et al., 2016). Par conséquent, le niveau bas de ces médiateurs dans le cerveau des souris *P. berghei* ANKA traitées avec *T. albida* pourrait expliquer l'amélioration de survie obtenue dans notre étude. En outre, la **figure 28** montre un niveau d'expression de *P. berghei* ANKA quasiment nul dans les cerveaux des souris traitées avec *T. albida* ou la chloroquine, au contraire des souris non traitées. Ce résultat suggère que *T. albida*, de même que la chloroquine, permet de réduire l'accumulation de globules rouges infectées dans les cerveaux de souris.

Pour s'assurer que la baisse du niveau d'expression des médiateurs pro-inflammatoires n'est pas associée à l'activité antiparasitaire de *T. albida*, nous avons ensuite étudié l'influence de *T. albida* sur des macrophages péritonéaux des souris C57BL/6 stimulés *in vitro* au LPS/IFN γ . Pour rappel, l'activation des macrophages par cette voie classique favorise l'expression de cytokines pro-inflammatoires caractéristique du phénotype M1, alors que la voie alternative stimule la production des cytokines anti-inflammatoire de type M2 (Mantovani et al., 2004). Il a été rapporté par Torre et al. que la stimulation des macrophages par *P. falciparum* induit l'expression des cytokines pro-inflammatoires de type Th1 impliquées dans la clairance parasitaire, mais également dans la sévérité du paludisme (Torre, 2009).

Ainsi, comme le montre la **figure 29**, le traitement des macrophages par *T. albida* permet de diminuer l'expression du TNF, de l'IL-12, l'IL-1 β , NF κ B, et iNOS, marqueurs qui caractérisent le phénotype M1 et d'augmenter l'expression de CD36 et de l'hème oxygénase (HO-1), deux marqueurs M2 (Mantovani et al., 2004; Qin et al., 2017).

La voie NF κ B constitue la voie de signalisation de nombreux médiateurs pro-inflammatoires et est impliquée dans les maladies inflammatoires chroniques. Son activation conduit à la production excessive de cytokines pro-inflammatoires, chemokines, et de molécules d'adhésion (Liu et al., 2017; Tripathi et al., 2009). D'autre part, l'oxyde nitrique synthase inductible

(iNOS) est une enzyme induisant la production d'oxyde nitrique (NO) dont le rôle différentiel allant de la défense de l'hôte à la sévérité du paludisme a été rapporté (Bergmark et al., 2012; Cabrales et al., 2011; Clark and Cowden, 2003; Maneerat et al., 2000). En ce qui concerne le TNF et l'IL-1 β , des études effectuées chez des enfants atteints de paludisme cérébral ont fourni des preuves solides que leur production accrue est associée à la dégénérescence neuronale (Armah et al., 2005). Le TNF favorise la séquestration des érythrocytes infectés dans le cerveau *via* l'induction de l'expression de molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales vasculaires (Che et al., 2000; Lou et al., 2001). Comme décrit précédemment, l'IL-12 produite par les cellules dendritiques favorise la différenciation des cellules Th1 impliquées dans la production de médiateurs pro-inflammatoires (Bettelli and Kuchroo, 2005; Dunst et al., 2017; McNab et al., 2015).

Par ailleurs, le récepteur CD36 impliqué dans la phagocytose des érythrocytes parasités non opsonisés (Patel et al., 2004) était exprimé de façon accrue dans les cellules traitées avec *T. albida*. Par analogie, ces résultats suggèrent que l'extrait de *T. albida* pourrait orienter la polarisation des macrophages vers un phénotype M2 au cours de l'infection palustre, permettant d'atténuer l'inflammation et prévenir les lésions tissulaires. Nous avons également observé l'induction de HO-1 suite au traitement des cellules avec *T. albida*. Cette enzyme est associée à la protection des formes graves du paludisme en modulant le stress oxydatif par dégradation de l'hème libre (Pereira et al., 2018).

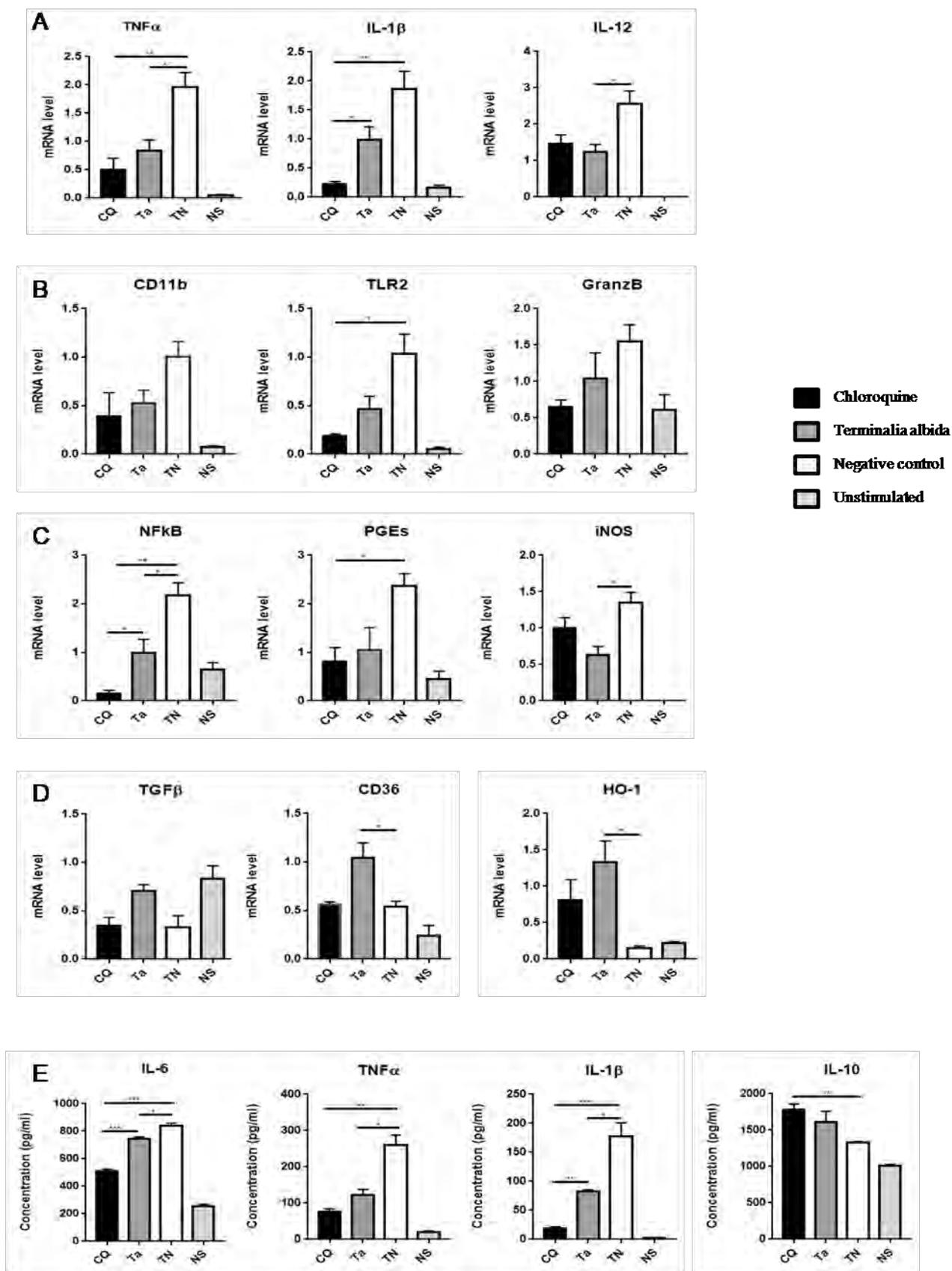


Figure 29 : Etude *in vitro* des propriétés anti-inflammatoires de *Terminalia albida*.

Pour confirmer les propriétés antioxydantes de *T. albida*, nous avons mesuré sa capacité à neutraliser les ROS dans des cellules de foie humaines HepG2. Il est important de rappeler que les ROS sont d'excellents antiparasitaires ; la plupart des antipaludiques tels que la chloroquine agit en bloquant la polymérisation de l'hème en hémozoïne, ce qui induit un stress oxydant toxique pour le parasite (Pandey et al., 2001). Toutefois, étant donné que les phagocytes produisent également des ROS en détruisant les globules rouges parasités, une expression accrue de ces molécules est caractéristique du paludisme cérébral pouvant mettre en jeu le pronostic fonctionnel et vital de l'hôte (Percário et al., 2012). En outre, il a été démontré que la production de ROS est associée à la production marquée de médiateurs pro-inflammatoires (Ty et al., 2019), de molécules d'adhésion sur l'endothélium (Becker et al., 2004) et de lésions tissulaires (Mittal et al., 2013). Nos résultats montrent pour *T. albida* une remarquable activité antioxydante dose-dépendante (**Figure 30**). L'indice antioxydant (IA) calculé à partir de l'aire sous les courbes était de 997 à des concentrations supérieures ou égales à 60 µg/mL et l'EC₅₀ de l'extrait était de 10,2 µg/mL.

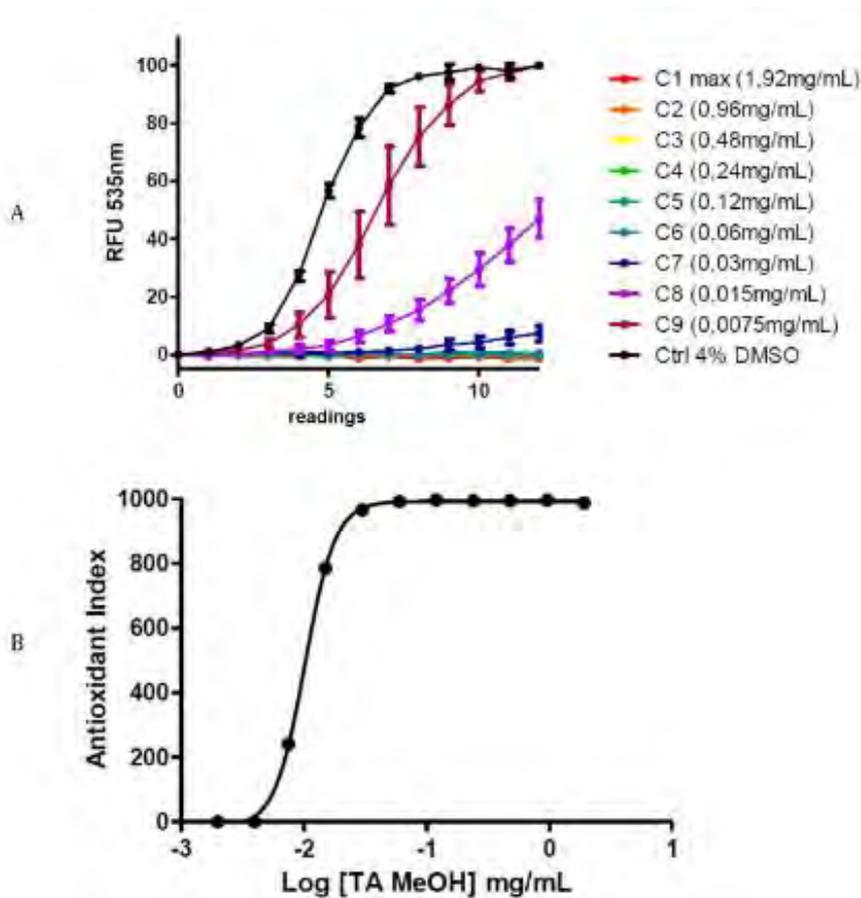


Figure 30 : Evaluation de l'effet antioxydant cellulaire de *Terminalia albida* par la méthode LUCS.

IV. Travaux personnels – Chapitre 2

Pour corréler nos résultats biologiques à la composition chimique de la plante, l'analyse dérégulative nous a permis de conclure que l'extrait méthanolique de *T. albida* est un mélange de tanins, de triterpènes, de phénols et de flavonoïdes. Ces composés sont connus pour leur large spectre d'action et pourraient justifier en partie l'effet bénéfique de *Terminalia* dans l'activité antiparasitaire et l'inhibition des mécanismes pro-inflammatoires et pro-oxydants au cours du paludisme cérébral. Cette analyse est plus détaillée dans le chapitre 3.

Ces résultats font l'objet d'un article publié dans la revue Malaria Journal intitulé « *Terminalia albida* treatment improves survival in experimental cerebral malaria through reactive oxygen species scavenging and anti-inflammatory properties » (voir Annexe).

Chapitre 3 : Etude déréplicative des échantillons de *T. albida*

1. Introduction

Comme décrit précédemment, l'évaluation biologique de deux échantillons de *T. albida* d'origines différentes nous a permis de mettre en évidence la variabilité de l'activité biologique en fonction des lieux de récolte. *In vitro*, l'échantillon de Dubréka (*TaD*) était plus actif contre la souche chloroquino-résistante *PfK1* avec une IC_{50} de 1,5 $\mu\text{g/ml}$ versus 8,5 $\mu\text{g/ml}$ pour l'extrait en provenance de Kankan (*TaK*). *In vivo*, les effets observés sur les souris infectées par *PbA* ou *Pcc* et traitées avec *TaD* ou *TaK* ont été différents. L'effet antiparasitaire de *TaD* a été remarquable avec une inhibition parasitaire de 56% à J10 dans l'infection *Pcc* et de 61% à J8 dans le modèle *PbA* contre 14% et 19% d'inhibition respectivement pour le traitement avec *TaK*. De plus, le traitement avec *TaD* a amélioré davantage la survie des souris *PbA* de 50% alors que le taux de mortalité des souris traitées avec *Tak* était similaire au groupe non traité. L'objectif de ce travail est donc de tenter de mieux comprendre les raisons de ces différences d'activités biologiques obtenues pour deux lots géographiquement différents d'une même espèce de *Terminalia* à travers l'étude des profils chimiques de ces extraits par LC-MS, corrélés aux activités biologiques obtenues.

2. Matériels et méthodes

2.1. Equipement d'UHPLC-HRMS

L'analyse LC/MS des extraits méthanoliques de *Terminalia albida* (1 mg / mL) a été réalisée à l'aide d'un spectromètre de masse de type Orbitrap XL UHPLC-DAD-LTQ (Thermo Fisher Scientific, Royaume-Uni) équipé d'une source d'ionisation par électro spray (ESI). Le système UHPLC est constitué d'un système UltiMate 3000 UHPLC (Thermo Fisher Scientific, Royaume-Uni) équipé d'une colonne Acquity BEH C18 (100 x 2,1 mm de diamètre, 1,7 μm , Waters, États-Unis). La phase mobile utilisée est un système acide formique-eau 0,1% (solvant A) et acide formique-acétonitrile 0,1% (solvant B). Le gradient suivant a été utilisé : 0-0.5 min, 95% A ; 0.5-12 min, 95-5% A ; 12-15 min, 5% A ; 15-15,5 min, 5-95% A ; 15,5-19 min, 95% A. Le débit de la phase mobile était de 0,3 mL/min, le volume d'injection était de 2 μl et la température de la colonne était maintenue à 40 °C. La source d'ionisation est de type électro-spray (ESI) et les échantillons ont été analysés dans les deux modes, négatif (NI) et positif (PI).

2.2. Conditions d'analyse

Les conditions d'analyses sont les suivantes : tension capillaire à 3,0 kV et 4,2 kV pour NI et PI respectivement, et température capillaire à 300 °C. La détection UV a été effectuée par un détecteur à barrettes de diodes (DAD) aux longueurs d'ondes comprises entre 210 à 400 nm. Les spectres de masse complets ont été enregistrés entre 100 et 1500 Da. Les spectres de masse de dissociation induite par collision (CID) ont été obtenus pour les quatre ions les plus intenses de chaque MS fullscan en utilisant les paramètres suivants : énergie de collision normalisée à 35%, largeur d'isolement 2 Da, activation Q 0,250. L'étalonnage en masse externe a été effectué avant le début de l'expérience.

2.3. Traitement des données et analyse statistique

Le traitement des données et l'analyse statistique ont été effectués comme décrit précédemment par (Chassagne et al., 2018). En bref, les données brutes obtenues par UHPLC-HRMS ont été traitées avec la version 2.56 de MS-Dial, pour l'extraction du signal de masse et l'alignement des pics. La liste de pics résultante a ensuite été portée dans un format de fichier CSV (comma-separated value) avant de procéder à l'analyse des données multivariées à l'aide de SIMCA-P+ version 14.0 (Umetrics, Suède). La prédiction de la formule moléculaire et l'annotation composée des caractéristiques significatives (m/z, paires de RT) ont été calculées à l'aide de la version 2.10 de MS-FINDER. Seules les bases de données de produits naturels axées sur les plantes ont été sélectionnées (UNPD, KNApSAcK, PlantCyc, Dictionary of Natural Products (DNP, CRC press, v25:2) et CheBI). L'interrogation de la base de données a été effectuée selon un processus en trois étapes. Les composés déjà connus pour être présents dans les espèces végétales ont d'abord été analysés, puis ceux connus pour être présents dans la famille botanique, et enfin, les molécules présentes dans toutes les bases de données de plantes ont été interrogées. Les résultats ont été présentés sous la forme d'une liste de composés triés selon une valeur de score pour chaque correspondance. Cette valeur comprenait l'incertitude sur la masse exacte, le score du modèle isotopique et la fragmentation MS/MS expérimentale reflétée par la fragmentation *in silico* de la structure candidate.

3. Résultats et discussion

La déréplication consiste à formuler des hypothèses sur les composés d'un extrait complexe sans purifier ces produits au préalable. Elle utilise notamment le couplage de la CLHP analytique à des détecteurs UV à barrettes de diodes, des spectromètres de masse voire des spectromètres RMN permettant d'obtenir pour chaque produit de l'extrait un spectre de masse. La comparaison des données spectrales obtenues à celles des produits de chimiothèques permet d'avoir une idée de leur originalité structurale. Dans ce contexte, une analyse LC/HRMS a été réalisée sur les échantillons de *T. albida* d'origines différentes. Comme l'illustre le Tableau 8, la différence chimique des extraits pourrait servir de marqueur caractéristique pour les échantillons de chaque origine. Ce travail constitue le premier rapport sur la composition chimique de *T. albida* et de l'étude comparative d'une même espèce d'origines différentes. Au total, 38 composés ont été identifiés à l'aide de MS-finder et de la base de données DNP dont 15 étaient identiques aux deux échantillons. Pour les différences chimiques, 9 composés ont été identifiés uniquement dans l'échantillon de Dubréka contre 14 dans l'échantillon de Kankan.

Ainsi, les principaux groupes phytochimiques étaient des polyphénols, des triterpènes, des acides phénoliques, des alcaloïdes, des tanins et des flavonoïdes déjà identifiés dans le genre *Terminalia*. De tous les composés identiques aux deux extraits, l'acide ellagique semble être le composé principal de la plupart des plantes antipaludiques (Dell'Agli et al., 2003; Muganga et al., 2014; Ndjonka et al., 2012). Son effet potentialisateur de certains médicaments antipaludiques a été démontré *in vitro* contre la souche W2. De plus, chez les souris infectées par *P. vinckei petteri*, le traitement avec l'acide ellagique par voie intrapéritonéale a permis une suppression de la densité parasitaire de 100% à la dose de 50 et 100 mg/kg (Soh et al., 2009).

Par ailleurs, bien que ces activités ne soient pas décrites dans le contexte du paludisme, l'acide ellagique est connu pour ses propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes et neuroprotectrices. Sur les macrophages (RAW267.4) stimulés par le LPS, l'acide ellagique isolé de *Punica granatum* a montré un effet inhibiteur des médiateurs pro-inflammatoires, notamment l'IL-6, l'oxyde nitrique (NO) et la prostaglandine E₂ (PGE-2) (BenSaad et al., 2017). La présence d'un groupe phénolique pourrait également être responsable de son effet antioxydant. Il est connu que lors du paludisme cérébral, l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique peut être atteinte, suite à la production de cytokines et chemokines pro-inflammatoires conduisant ainsi à des symptômes neurologiques graves (Dunst et al., 2017; Hawkes et al., 2013; Storm and Craig, 2014). Or, il a été démontré que l'acide ellagique a des effets neuroprotecteurs en renforçant l'effet neurotrophique par activation des astrocytes, cellules responsables du maintien et de la

survie des neurones (Wang et al., 2019). L'effet neuroprotecteur de l'acide ellagique réside en son pouvoir antioxydant (Goudarzi et al., 2019).

Concernant les autres composés communs aux deux échantillons, les propriétés inflammatoires et anti-inflammatoires de la corilagin ont été démontrées. Dans une étude de Kolodziej et al., il a été constaté que la corilagin augmentait le niveau d'expression de cytokines pro-inflammatoires et de l'oxyde nitrique synthase dans la lignée cellulaire de macrophages murins RAW 264.7 infectés par *Leishmania* (Kolodziej et al., 2005). Cependant, une étude récente a démontré que la corilagin présente dans une fraction d'extrait pourrait être associée à l'effet inhibiteur de la production des cytokines et des médiateurs pro-inflammatoires (TNF, IL-1 β , IL-6, iNOS et COX-2) en inactivant la voie NF κ B et en bloquant les récepteurs TLR dans la lignée RAW 264.7 stimulée par du LPS (Wu et al., 2018). D'autre part, les propriétés neuroprotectrices de l'eschweilenol C ont été prouvées sur des cellules gliales stimulées au LPS. Ce composé a la capacité d'inhiber les réponses pro-inflammatoires en bloquant l'activation du facteur de transcription NF κ B (Rodrigues de Araújo et al., 2019).

En outre, parmi les composés chimiques différents, l'epigallocatechin gallate (EGCG), identifié uniquement dans l'extrait de *Terminalia* d'origine Dubréka, est largement étudié pour sa bioactivité polyvalente. En plus de son activité antiplasmodiale (Tasdemir et al., 2006) et de son effet potentialisateur de l'artémisinine (Sannella et al., 2007), l'EGCG inhibe trois enzymes importantes (FabG, FabZ et FabI) impliquées dans la biosynthèse des acides gras de *P. falciparum* avec des IC₅₀ de 0,3 ; 0,4 et 0,2 μ M respectivement (Tasdemir et al., 2006). Il est bien documenté que la principale complication du paludisme sévère est la séquestration des globules rouges parasités dans les capillaires d'organes *via* les molécules d'adhésion de l'endothélium notamment ICAM-1 et VCAM (Bruneel, 2019; Storm and Craig, 2014). Or, il a été rapporté que l'EGCG à faible dose inhibe la cythoadhérence des isolats de patients (Patil et al., 2011) en raison de sa capacité à se lier à la molécule d'adhésion ICAM-1 (Dormeyer et al., 2006). En outre, il a été prouvé que l'EGCG et ses métabolites atteignent à faible dose le parenchyme cérébral à travers la barrière hémato-encéphalique et préviennent le dysfonctionnement cognitif des souris (Pervin et al., 2017; Unno et al., 2017). De plus, leur présence dans le cerveau réduit les dommages oxydatifs par inhibition du stress oxydant en favorisant la prolifération et la différenciation des cellules neuronales (Pervin et al., 2017).

Autre fait important, la NADPH-oxydase étant une enzyme essentielle dans l'induction du stress oxydant, il a été rapporté que l'acide arjunolique trouvé dans *TaD* est un puissant antioxydant en bloquant les événements pouvant activer cette enzyme tels que la

phosphorylation de la p47 phox par les protéines kinase c dans les neutrophiles et empêcher par conséquent la production de ROS (Miriyyala et al., 2015). Corroborant cette étude, le composé a été recommandé dans la prévention des accidents vasculaires cérébraux par sa capacité à supprimer les réactions oxydatives impliquées dans le dommage des neurones, et à réguler positivement les enzymes antioxydantes (Yaidikar and Thakur, 2015). De plus, sa capacité à inhiber l'oxyde nitrique synthase inductible iNOS, productrice d'oxyde nitrique (NO), est également démontré (Kumar et al., 2018; Yang et al., 2014). Par ailleurs, l'effet antioxydant de la phlorizine associée à la prolongation de la durée de vie chez les *Drosophila melanogaster* a été prouvée (Wang et al., 2018).

L'analyse des profils chimiques de l'extrait de *TaK* montrent que les métabolites présents dans cette plante ont été peu décrits pour leur activité antiplasmodiale et immunomodulatrice (**Tableau 8**). A notre connaissance, seule la punicalagine a montré une activité *in vitro* modérée contre les souches de *P. falciparum* telles que 3D7 (IC₅₀ = 9,42 µg/mL), K1 (IC₅₀ = 8,79 µg/mL), D6 (IC₅₀ = 7,5 µg/mL) et W2 (IC₅₀ = 8,8 µg/mL) (Reddy et al., 2007; Shuaibu et al., 2008). Etant donné que la distinction biologique d'un matériel végétal peut découler de la composition chimique (Tian et al., 2016), les propriétés biologiques des composés chimiques spécifiques retrouvés dans l'extrait de *TaD* (**Figure 31**) pourraient potentialiser son effet et expliquer éventuellement cette divergence d'activité. D'autre part, l'extrait de *TaK* semble être plus riche d'un point de vue chimique que l'extrait de *TaD*, ce qui pourrait atténuer les effets biologiques de certaines substances dans cet échantillon.

Toutefois, pour confirmer ces hypothèses, il serait intéressant de procéder à une analyse métabolomique suivant la méthodologie décrite par Chassagne (Chassagne et al., 2018) afin de relier la bioactivité des extraits à une classe de molécule ou à une molécule donnée.

Tableau 8 : Analyses déréplicatives des extraits méthanoliques de *TaD* et *TaK* par HRMS et MS/MS en utilisant les bases de données MS Finder et DNP.

N° de produit	RT (min)	m/z	Δ Da	Formule brute	Hypothèse	Classe chimique	Trouvé dans		Activité anti-inflammatoire et antiplasmodiale	Référence
							<i>TaD</i>	<i>TaK</i>		
1	2.69	469.0038 [M-H] -	-0.0003489	C ₂₁ H ₁₀ O ₁₃	flavogallonic acid	Hydrolyzable tannins	●	●	Activité antiplasmodiale modérée	(Shuaibu et al., 2008)
2	5.9	641.3692 [M+H] +	0.0014128	C ₃₇ H ₅₂ O ₉	23-Galloylarjunolic acid	Triterpenoids	●	●	Non rapporté	
3	4.95	315.0139 [M-H] -	-0.0018512	C ₁₅ H ₈ O ₈	3-O-Methylellagic acid	Hydrolyzable tannins	●	●	Non rapporté	
4	6.61	345.061 [M+H] +	0.0016802	C ₁₇ H ₁₂ O ₈	Nasutin B	Hydrolyzable tannins	●	●	Non rapporté	
5	3.36	633.0721 [M-H] -	-0.0004476	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₈	Corilagin	Hydrolyzable tannins	●	●	Anti-inflammatoire	(Wu et al., 2018)
6	6.01	519.3322 [M+H] +	0.0014948	C ₃₀ H ₄₆ O ₇	Cucurbitacin F	Cucurbitacins	●	●	Non rapporté	
7	4.27	300.9984 [M-H] -	0.0007995	C ₁₄ H ₆ O ₈	Ellagic acid	Hydrolyzable tannins	●	●	Antipaludique, anti-inflammatoire,	(BenSaad et al., 2017; Soh et al., 2009)
8	4.11	447.0561 [M-H] -	0.001142	C ₂₀ H ₁₆ O ₁₂	Eschweilenol C	Hydrolyzable tannins	●	●	Anti-inflammatoire	(Rodrigues de Araújo et al., 2019)
9	5.85	487.3421 [M+H] +	0.0019794	C ₃₀ H ₄₆ O ₅	Astrantiagenin J	Triterpenoids	●	●	Non rapporté	

IV. Travaux personnels – Chapitre 3

10	7.04	547.3265 [M-H] -	0.0009789	C ₃₁ H ₄₈ O ₈	Quadrangularic acid F	Cycloartanols and derivatives	●	●	Non rapporté	
11	5.3	817.4001 [M-H] -	-0.000099	C ₄₃ H ₆₂ O ₁₅	Quadranoside XI	Triterpene saponins	●	●	Non rapporté	
12	5.65	521.0927 [M-H] -	-0.0000521	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₄	Quercetagenin 7-(6"-acetylglucoside)	Flavonoid-7-O-glycosides	●	●	Non rapporté	
13	5.61	667.4061 [M+H] +	-0.0015523	C ₃₆ H ₅₈ O ₁₁	Quercilicoside A	Triterpene saponins	●	●	Non rapporté	
14	5.9	801.405 [M-H] -	0.0008995	C ₄₃ H ₆₂ O ₁₄	Russelioside G	Steroidal glycosides	●	●	Non rapporté	
15	3.97	600.9883 [M-H] -	-0.0002343	C ₂₈ H ₁₀ O ₁₆	Terminalin	Hydrolyzable tannins	●	●	Non rapporté	
16	12.17	754.585 [M+H] +	0.0016545	C ₄₃ H ₇₉ NO ₉	Chrysogeside D	Fatty acyl glycosides of mono and disaccharides	●	●	Non rapporté	
17	1.15	214.09 [M+H] +	-0.0009109	C ₁₃ H ₁₁ NO ₂	Bruceolline E	Indoles	●	●	Non rapporté	
18	5.19	505.3526 [M+H] +	-0.0010109	C ₃₀ H ₄₈ O ₆	Myrianthic acid	Triterpenoids	●	●	Non rapporté	
19	7.67	489.3578 [M+H] +	0.0012948	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	Arjunolic acid	Triterpenoids	●	●	Neuroprotecteur	(Yaidikar and Thakur, 2015)
20	4.61	435.1287 [M-H] -	0.0003775	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₀	Phlorizin	Flavonoid O-glycosides	●	●	Immunomodulateur	(Wang et al., 2018)

IV. Travaux personnels – Chapitre 3

21	3.46	759.1191 [M-H] -	-0.000299	C ₃₇ H ₂₈ O ₁₈	Prodelfinidin A2 3'-gallate	Biflavonoids et polyflavonoids	●	●	Non rapporté	
22	7.8	529.3167 [M-H] -	0.0013078	C ₃₁ H ₄₆ O ₇	Acinospesigenin B	Triterpenoids	●	●	Non rapporté	
23	3.8	457.0765 [M-H] -	0.0012078	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁	Epigallocatechin gallate	Catechin gallates	●	●	Antipaludique anti-inflammatoire, neuroprotecteur, immunomodulateur	(Patil et al., 2011; Pervin et al., 2017; Sannella et al., 2007; Tasdemir et al., 2006)
24	0.92	783.0694 [M+H] +	0.0006408	C ₃₄ H ₂₂ O ₂₂	Punicalin	Hydrolyzable tannins	●	●	Anti-inflammatoire	(BenSaad et al., 2017)
25	7.19	505.3526 [M+H] +	0.0009774	C ₃₀ H ₄₈ O ₆	Protobassic acid	Triterpenoids	●	●	Non rapporté	
26	7.48	359.0767 [M+H] +	0.0012374	C ₁₈ H ₁₄ O ₈	5,3'-Dihydroxy-4',5'-dimethoxy-6,7methylenedioxyisofl avone	3'-hydroxy, 4'-methoxyisoflavonoid	●	●	Non rapporté	
27	5.56	329.0296 [M+H] -	-0.003745	C ₁₆ H ₁₀ O ₈	3,3'-di-O-Methylellagic acid;3,3'-Dimethoxyellagic acid	Hydrolyzable tannins	●	●	Non rapporté	
28	2.2	933.0623 [M+H] -	0.0003774	C ₄₁ H ₂₆ O ₂₆	Vescalagin	Hydrolyzable tannins	●	●	Non rapporté	
29	3.79	1083.0574 [M+H] -	0.0011788	C ₄₈ H ₂₈ O ₃₀	Punicalagin	Hydrolyzable tannins	●	●	antiplasmodial	(Reddy et al., 2007;

IV. Travaux personnels – Chapitre 3

										Shuaibu et al., 2008)
30	4.57	450.9933 [M+H] -	-0.0004062	C ₂₁ H ₈ O ₁₂	Flavogallol	Hydrolyzable tannins	●	●	Non rapporté	
31	6.46	327.014 [M+H] -	0.0006908	C ₁₆ H ₈ O ₈	Pteleoellagic acid.		●	●	Non rapporté	
32	7.67	533.348 [M+H] -	0.0007408	C ₃₁ H ₅₀ O ₇	Methyl 4,23, 29-trihydroxy-3,4-seco-olean-12-en-3-oate-28-oic acid	17-hydroxysteroids	●	●	Non rapporté	
33	3.67	463.0507 [M+H] -	-0.0007903	C ₂₀ H ₁₆ O ₁₃	Ellagic acid glucoside	Hydrolyzable tannins	●	●	Non rapporté	
34	4	433.0403 [M+H] -	0.0011876	C ₁₉ H ₁₄ O ₁₂	Ellagic acid arabinoside	Hydrolyzable tannins	●	●	Non rapporté	
35	6.26	817.4003 [M+H] -	0.0027568	C ₄₃ H ₆₂ O ₁₅	Quadranoside XI;(+) - Quadranoside XI	Triterpene saponins	●	●	Non rapporté	
36	6.24	627.0978 [M+H] -	0.0010289	C ₂₉ H ₂₄ O ₁₆	1-O-p-(E)-Coumaroyl-4,6-(S)-HHDP-beta-D-glucopyranose	Hydrolyzable tannins	●	●	Non rapporté	
37	7.2	503.3364 [M+H] -	0.0010639	C ₃₀ H ₄₈ O ₆	Tomentosic acid	Triterpenoids	●	●	Non rapporté	
38	3.19	483.077 [M+H] -	0.0016802	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₄	1,6-Digalloyl-beta-Dglucopyranose	Tannins	●	●	Non rapporté	

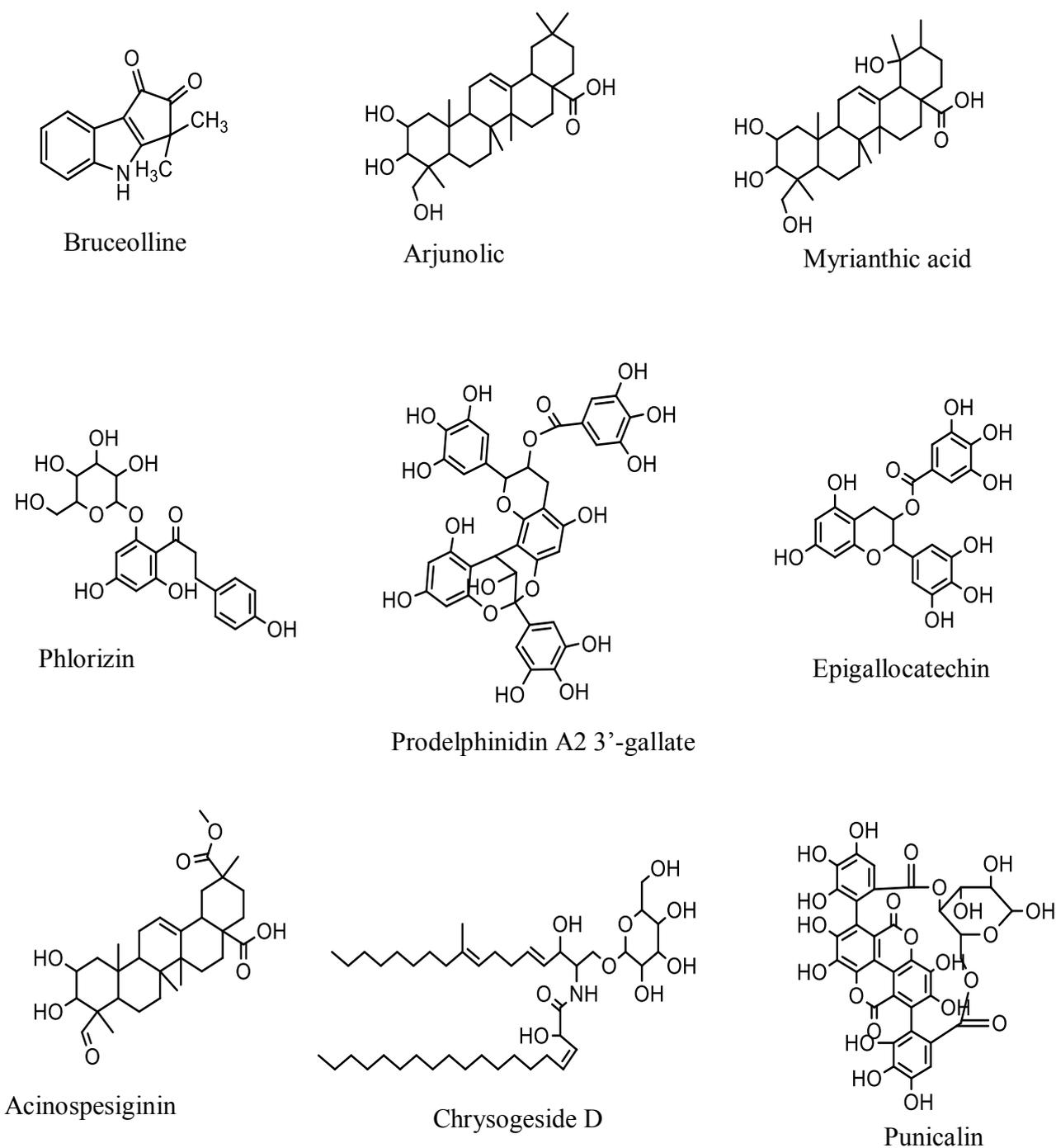


Figure 31 : Structures chimiques des 9 composés spécifiques de *T. albida* Dubréka identifiés par dérèplication.

Chapitre 4 : Etude botanique des échantillons de *Terminalia albida* Scott-Elliot (Combretaceae)

1. Introduction

L'étude des plantes médicinales est souvent confrontée à la difficulté de leur identification. Cela peut conduire à une variation des résultats entre différents acteurs de recherche pour la même plante et, par conséquent, à une conclusion erronée sur l'espèce. C'est pourquoi, dans la ligne directrice recommandée par l'OMS, l'identification botanique constitue une priorité dans la recherche et l'évaluation des médicaments à base de plante (OMS, 2000).

Au vu des résultats obtenus, cette étude a pour but de confirmer l'identité des deux échantillons de *T. albida* d'une part et, d'autre part, de fournir les éléments caractéristiques fiables qui pourront servir de standard pour ces espèces de plantes.

Dénominations

Nom scientifique : *Terminalia albida* Scott-Elliot (Combretaceae)

Synonymes : *T. angyrophylla* Engl. et Diels

Appellations vernaculaires : en Malinké : Ouolo nidié ; en Poular : Odiaguitel, Bori billel ; en Soussou : Kopera.

2. Matériel et méthode

2.1. Analyse macroscopique

L'analyse macroscopique a porté sur les caractéristiques morphologiques de l'écorce de tige à savoir la taille, la forme, la couleur et la disposition sur le bois.

2.2. Analyse microscopique

2.2.1. *Section transversale*

A l'aide d'une lame de rasoir, des coupes fines transversales ont été effectuées et mises à tremper dans la solution diluée d'hypochlorite de sodium pendant 10 min. Ces coupes ont ensuite été lavées deux fois avec de l'eau distillée, puis trempées dans le réactif de Mirande (Carmino-vert) pendant 3 min. Après la coloration, deux lavages à l'eau distillée ont été effectués. Sur une lame porte-objet, contenant préalablement une goutte de glycérine, une coupe colorée et nettoyée a été délicatement déposée et recouverte d'une lamelle tout en évitant la formation de bulles d'air. L'examen des tissus végétaux a été effectué à l'aide d'un microscope

optique (LYCA) relié à un appareil photo de marque NIKON pour obtenir l'image photo des tissus végétaux.

2.2.2. Drogue pulvérisée

L'analyse microscopique a été effectuée sur une poudre fine d'écorce de tige de *T. albida* suivant les instructions de la pharmacopée européenne en vigueur (chapitre 2.8.23).

Sur une lame en verre propre contenant 10 µl d'hydrate de chloral à 80 g/20 ml d'eau, une pincée de poudre prélevée à l'aide d'une spatule a été ajoutée pour obtenir un mélange homogénéisé. Le mélange a ensuite été recouvert d'une lamelle et chauffé délicatement jusqu'à ébullition afin d'éliminer les bulles d'air. L'examen a été ensuite effectué à l'aide d'un microscope LYCA relié à un appareil photo de marque NIKON.

3. Résultats

3.1. Description macroscopique

Comme le montre la **figure 32**, *Terminalia albida* Scott-Elliot est un arbuste ou un petit arbre savanicole pouvant atteindre 12 m de haut, à fût tortueux et cime ouverte, aux jeunes rameaux feuillés et florifères couverts de poils denses, soyeux et argentés ; l'écorce est crevassée, liégeuse et épaisse, gris-brun, à tranche orangée brunissant rapidement. Les feuilles adultes courtement pétiolées (pétiole pubescent de 10 à 20 mm) sont alternes ; leur limbe étroit, lancéolé ou oblancéolé, à extrémité acuminée obtuse ou pointue, à base plus ou moins arrondie et mesure de 7-10 à 20 (Sc.-Elliot) cm de long et 2 à 3 (Sc.-Elliot) 3-4.5 (Hutchinson) cm de large ; la face supérieure est luisante, la face inférieure couverte de poils apprimés (couchés), soyeux et argentés. La nervation pennée, peu saillante à la face inférieure, comporte (6)10 à 12(15) paires de nervures secondaires, ascendantes, se raccordant plus ou moins vers le sommet. Les fleurs, groupées par deux et entourées de petites bractées (4 mm de long), sont réunies en racème, axillaire, spiciforme, velouté, de 5 à 10 cm de long. Elles sont courtement pétiolées, apétales, bisexuées, régulières et comportent un calice à 5 lobes ovoïdes (2 mm) densément velus, des étamines à filament recourbé, au nombre de 10 et un ovaire infère surmonté d'un style unique ; de petits nectaires ridés (1 mm) portent de longs poils longs hirsutes (2-3 mm).

Les fruits sont des samares elliptiques à extrémité mucronée, plus longues que larges (5,5-6,5 cm de long et 2-3 cm de large), densément tomenteuses blanc soyeux, avec une aile disposée autour de la graine. La graine est allongée en fuseau.



Figure 32 : *Terminalia albida* Scott-Elliot.

L'écorce de tige des deux échantillons se présente sous forme de fragments allongés cintrés (**Figure 33a**) ou même vrillés sur eux même (**Figure 33b**). Elle est recouverte d'un suber épais, très squameux, ridé transversalement et crevassé longitudinalement, occupant parfois la moitié de la section ; les couches les plus externes s'exfolient très facilement. Les couches internes du suber, persistantes, ont un aspect brun foncé, elles sont marquées de fentes longitudinales et de fines rides transversales. Lorsqu'elle est privée du suber, l'écorce présente sur sa face externe une coloration brun rougeâtre, un aspect lisse très finement ridée longitudinalement. La face interne brun jaunâtre à brun orangé portant des taches brunes plus sombres, est finement striée longitudinalement. La cassure beige clair est fibreuse (**Figures 33a et 33b**).



Figure 33 : *T. albida* Scott-Elliot écorce de tige issue de Kankan (a) et de Dubréka (b).

3.2. Description microscopique des coupes transversales d'écorce de tige

La section transversale de l'écorce de tige s'avère difficile à réaliser. En effet, la dureté de l'écorce, sa structure stratifiée et l'abondance des fibres s'opposent à la réalisation d'une coupe fine et régulière. Les différentes parties de l'écorce se dissocient lors du montage. Montée dans le réactif de Mirande, la section transversale (**Figure 34**) présente de l'extérieur vers l'intérieur, les éléments suivants : Parenchyme cortical, Rayon médullaire, Amas de fibres, Parenchyme libérien, Cambium.

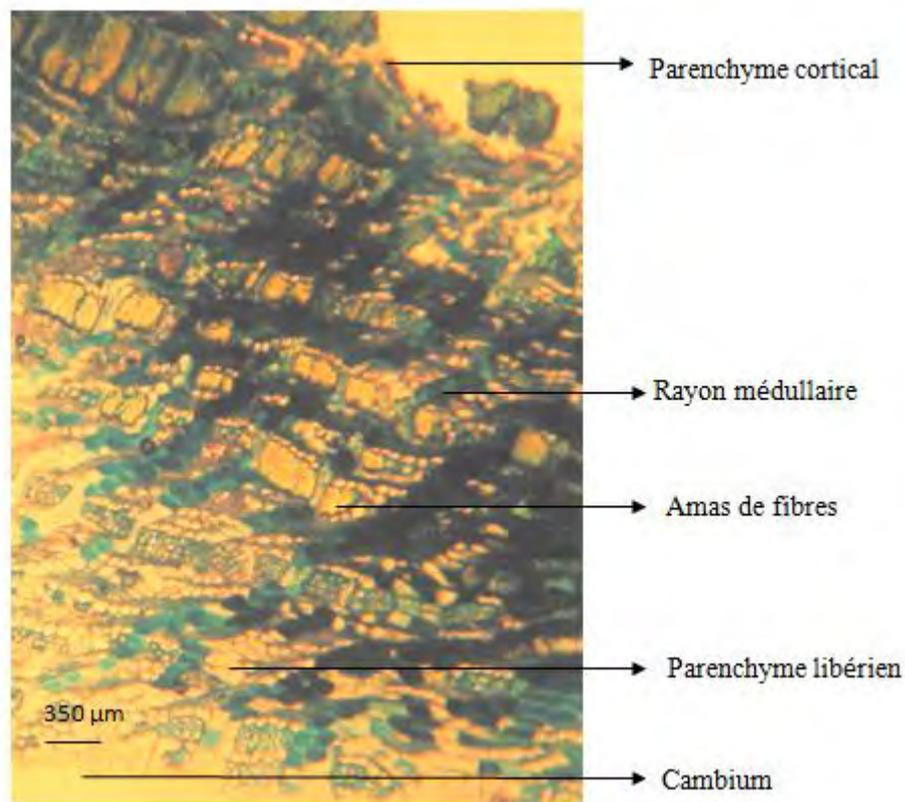


Figure 34 : *T. albida* Scott-Elliot : Section transversale de l'écorce de tige (privée du suber) - Aspect général.

Le tissu de revêtement (**Figure 35**), de structure secondaire, comprend un très grand nombre d'assises superposées, qui s'exfolient très facilement. Il est constitué des couches suivantes :

- Le suber, composé de plusieurs assises de cellules mortes, brunâtres, aplaties, plus ou moins rectangulaires ;
- L'assise génératrice subéro-phellodermique ;
- Le phelloderme réduit à une à trois assises de cellules superposées, peu différenciées.

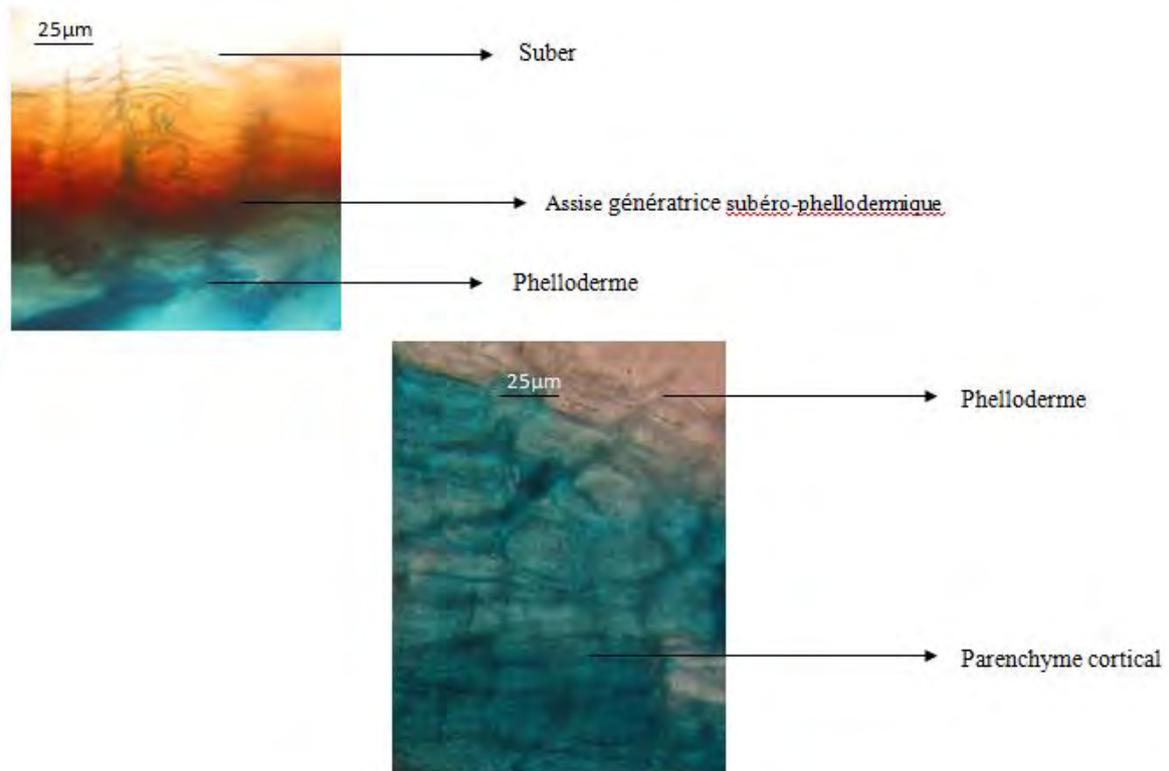


Figure 35 : *T. albida* Scott-Elliot : Section transversale de la partie externe de l'écorce de tige.

Le parenchyme cortical très réduit, composé de cellules plus ou moins arrondies à ovoïdes, à paroi légèrement épaissie et sclérifiée. Le liber occupe la majeure partie de la section transversale. Il est composé de couches successives de parenchyme libérien et de paquets de fibres libériennes (**Figure 36a**) lignifiées à paroi épaisse, amas d'autant plus importants qu'ils sont externes. L'ensemble est entrecoupé de rayons médullaires (**Figure 36b**) unis à bi-tri sériés à cellules à paroi fine, sauf au niveau des amas de fibres les plus externes. A ce niveau, les rayons médullaires sont constitués soit de cellules scléreuses arrondies à ovoïdes (**Figure 36c**), soit d'une longue cellule scléreuse (**Figure 37b**) (la longueur est égale à l'épaisseur des amas de fibres). Des macles d'oxalate de calcium se rencontrent dans tous les parenchymes. Elles sont souvent localisées soit dans des files de cellules situées à la limite inférieure des amas de fibres, soit dans des cellules isolées ; leur taille varie de 20 à 400 µm de diamètre (**Figure 37a**).

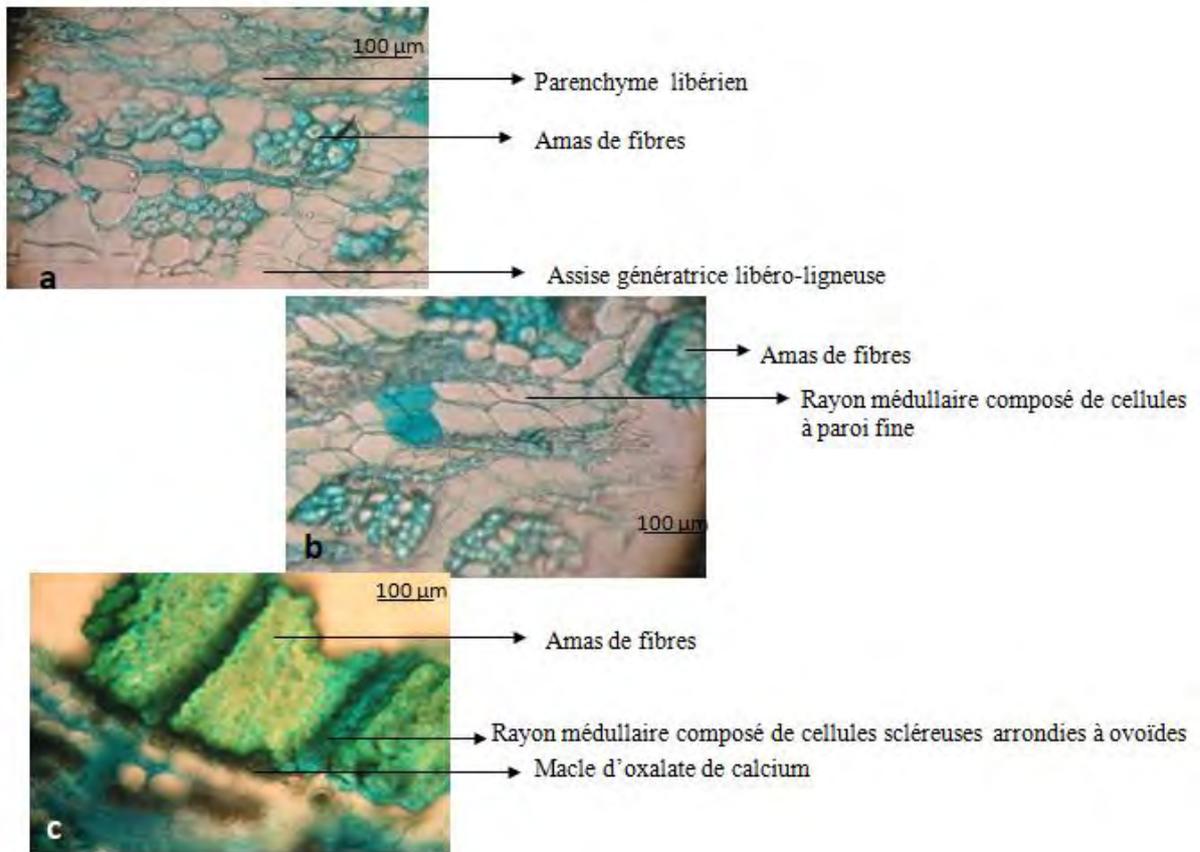


Figure 36 : *T. albida* Scott-Elliot : Section transversale de l'écorce de tige (photos successivement prises de l'intérieur vers l'extérieur).

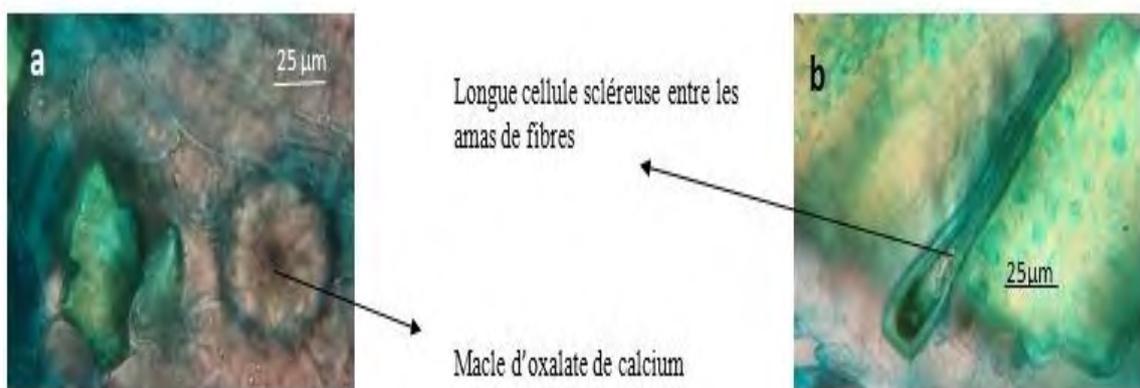


Figure 37 : *T. albida* Scott-Elliot : Détails de la section transversale de l'écorce de tige.

3.3. Description microscopique de la poudre des écorces de tige

L'écorce pulvérisée présente une coloration brun rougeâtre. Après montage dans la solution d'hydrate de chloral à 80 g/20 ml d'eau, l'ensemble des éléments, décrits dans la section transversale, sont retrouvés.

En particulier, on retrouve les éléments suivants :

- De très nombreuses fibres à extrémité effilée, paroi très épaisse faiblement canaliculée et lumière filiforme, généralement fragmentées, isolées (**Figure 38a**) ou en amas (**Figure 38b**) ; le plus souvent, les amas de fibres sont accompagnés de files de cellules parenchymateuses dont chacune contient une macle d'oxalate de calcium (**Figure 38c**) nettement visible en lumière polarisée (**Figure 38d**).

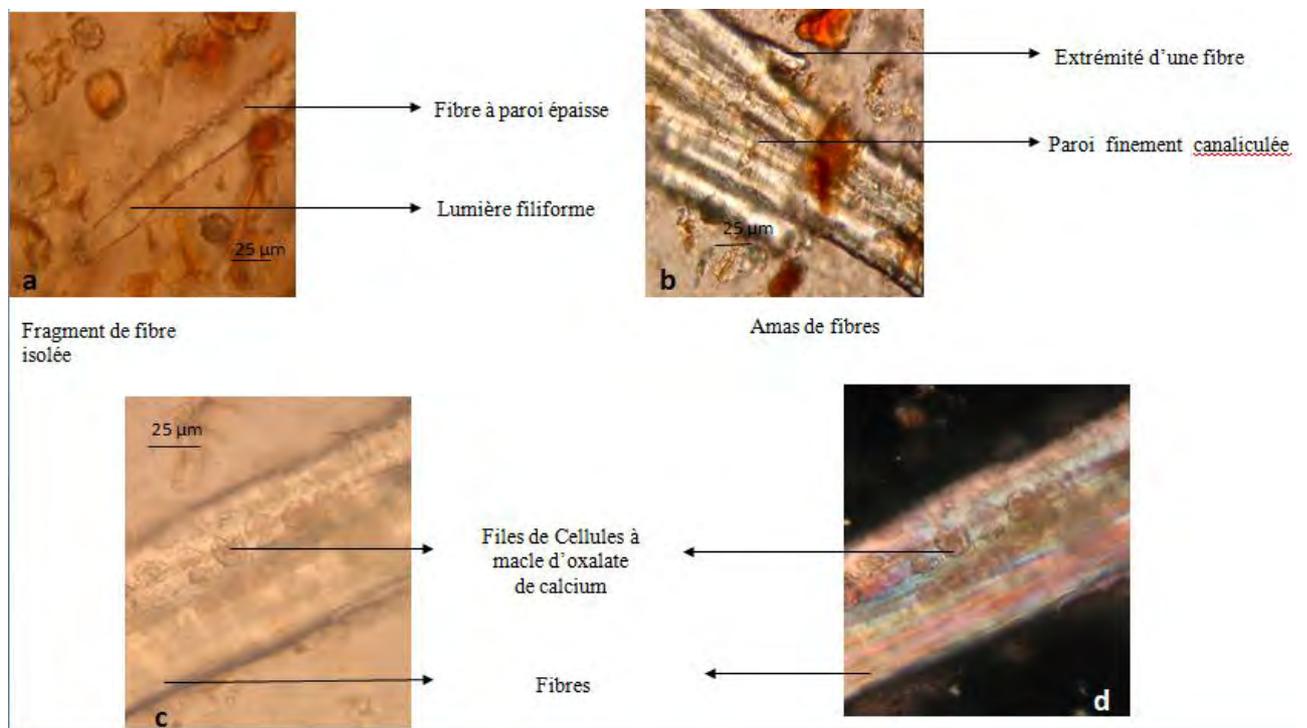


Figure 38 : *T. albida* Scott-Elliot : Examen microscopique de la poudre d'écorce de tige. (a) Fragment de fibre isolée ; (b) Amas de fibres ; (c, d) Macle d'oxalate de calcium.

- Des fragments de suber composés de plusieurs assises de cellules plus ou moins hexagonales empilées les unes sur les autres (vue de face) (**Figure 39**).



Figure 39 : *T. albida* Scott-Elliot : Suber vu de face.

- De très nombreuses macles d'oxalate de calcium de tailles très variables, les plus grosses pouvant atteindre jusqu'à 400 μm de diamètre, isolées (**Figures 40a, 40b, 40c**) ou dans des cellules (**Figures 40d et 40e**).

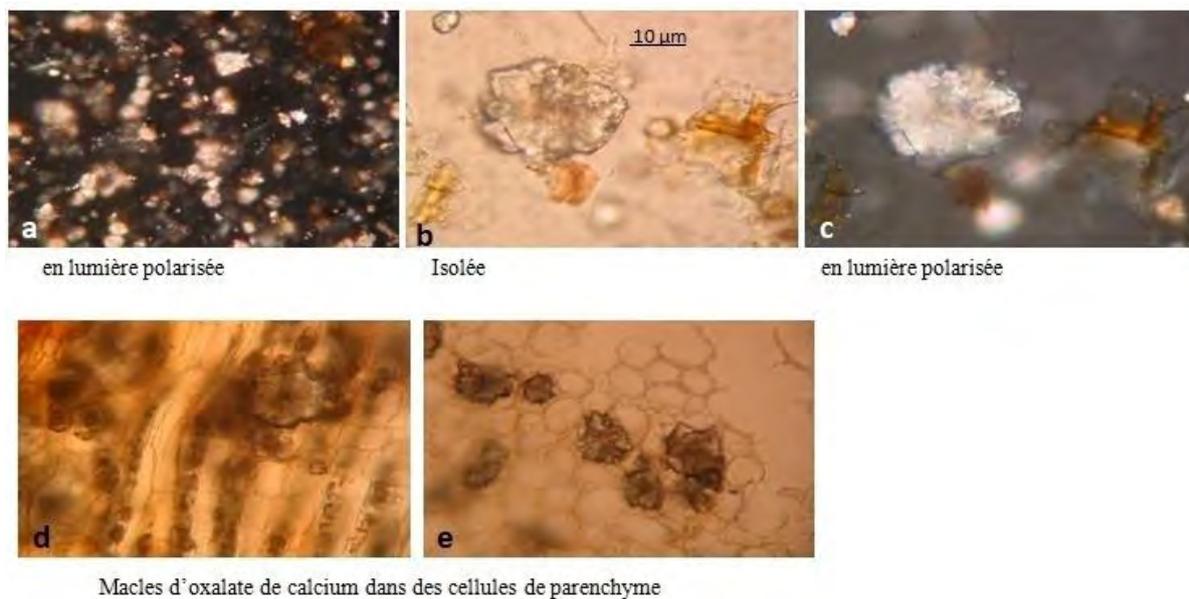


Figure 40 : *T. albida* Scott-Elliot : Les macles d'oxalate de calcium dans la poudre d'écorce de tige. (a, b, c) Macles d'oxalate de calcium isolées ; (d, e) Macles d'oxalate de calcium dans des cellules de parenchyme.

- Des cellules scléreuses de petite taille, de forme arrondie ou rectangulaire, à paroi peu épaisse et lumière large, isolées (**Figures 41a et 41b**) ou en amas (**Figure 41c**) provenant de rayons médullaires sclérifiés ou des assises externes du parenchyme cortical.

IV. Travaux personnels – Chapitre 4

- De rares cellules scléreuses de forme allongée provenant des rayons médullaires sclérifiés (**Figure 41d**).

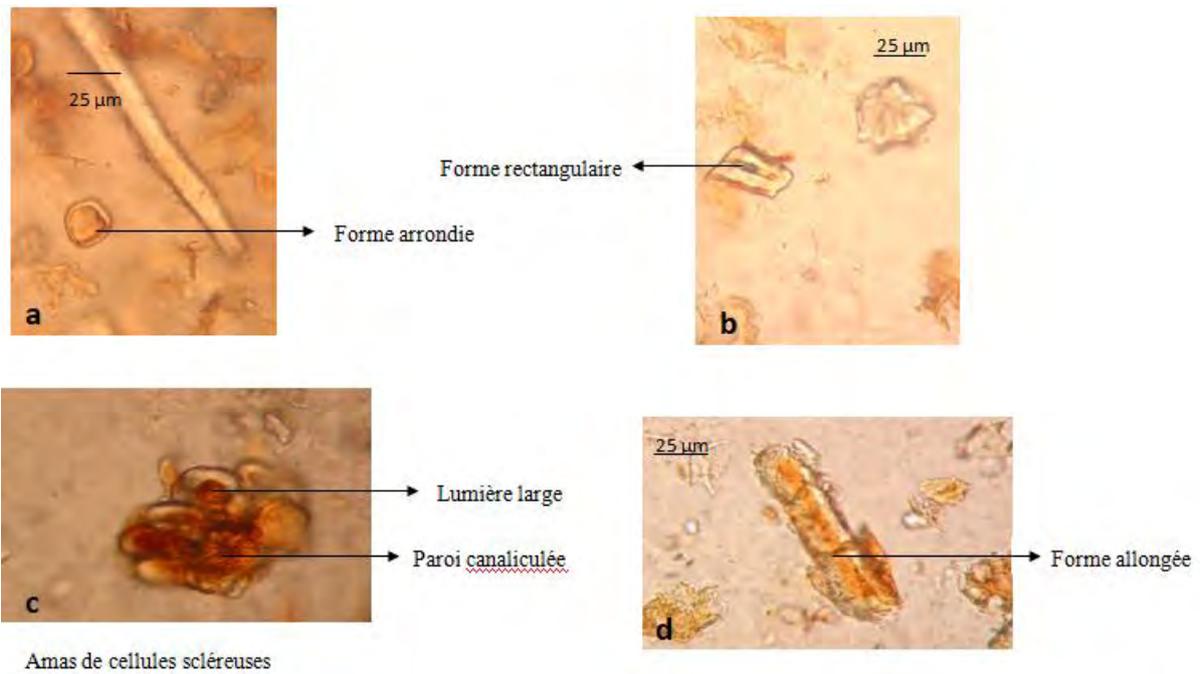


Figure 41 : *T. albida* Scott-Elliot : Différentes formes de cellules scléreuses dans la poudre d'écorce de tige. (a) Forme arrondie ; (b) Forme rectangulaire ; (c) Amas de cellules scléreuses ; (d) Forme allongée.

- Des grains d'amidon arrondie à ovoïde de 5 à 10 µm de diamètre isolés ou inclus dans des cellules de parenchyme (**Figure 42a et 42b**).

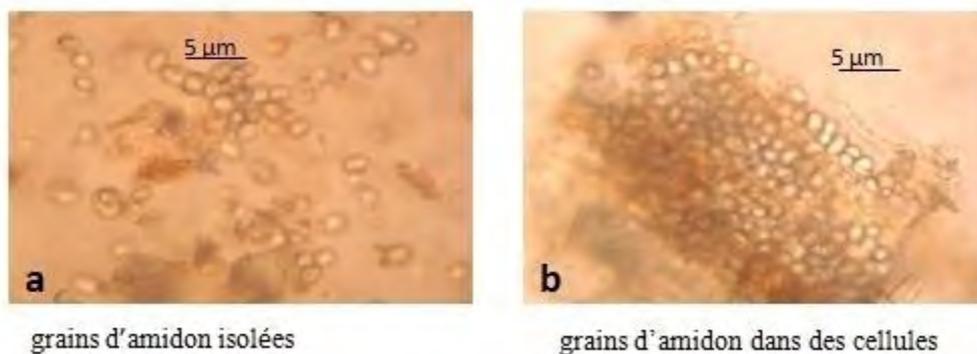


Figure 42 : *T. albida* Scott-Elliot : Présence de grains dans la poudre d'écorce de tige.

4. Discussion et conclusion

Relativement peu d'auteurs ont abordé l'étude anatomique des *Combretaceae*. La plupart se sont intéressés seulement à une partie de la plante et plus particulièrement au bois en raison de l'utilisation de nombreuses essences appartenant à cette famille (Rolando, 1997; Van Vliet, 1979). D'autres auteurs, comme VERHOEVEN en 1973 ou Al-mayah en 1983, ont étudié les *Combretaceae* dans le but de redéfinir la taxonomie de la famille (Al-Mayah, 1983; VERHOEVEN et al., 1973). L'étude anatomique des feuilles, ou celle des grains de pollen ont été envisagées mais pas celle de la tige et encore moins de l'écorce de tige. Enfin, certains auteurs ont abordé l'étude d'espèces spécifiques telles que *T. ivoirensis* (Lamb and Ntima, 1971) ou *T. pallida* (Siddaiah et Ravindra, 2015). L'étude anatomique de l'écorce de tige de *Terminalia albida* apporte un certain nombre d'éléments de diagnostic de l'espèce.

Dans la présente étude, nous avons noté dans les deux drogues d'origine différente la présence d'amas de fibres libériennes en strate déjà signalée dans *T. macroptera* (Haidara, 2018). Cependant, l'appareil sécréteur à gomme commun au genre *Terminalia* était absent dans les deux échantillons. Cela est peut-être dû au fait que nous n'avons pas examiné le bois de tige, ni la moelle ; la localisation des canaux ou poches à mucilage étant décrits autour de la moelle. Ainsi, la présence de cristaux d'oxalate de calcium est constante dans la famille des *Combretaceae*, qu'il s'agisse de prismes ou de macles. Dans notre analyse, nous n'avons rencontré que des macles sous deux formes : soit de petite à moyenne taille (de 10 à 50 μm) inclus dans des cellules de parenchyme libérien le plus souvent en file, soit de taille exceptionnelle (taille maximale mesurée 375 μm) dans des cellules hypertrophiées situées généralement au niveau des amas de fibres libériennes. Cependant, ces dernières ne sont abondantes que dans l'échantillon récolté à Dubréka. Vu l'épaisseur de l'écorce, il peut être supposé qu'il s'agisse d'un organe plus âgé que dans l'échantillon de Kankan. La dimension remarquable de ces macles peut être intéressante à considérer comme un élément de diagnostic de l'espèce lorsque seule la drogue (écorce de tige) est fournie. Nous n'avons pas trouvé, dans la littérature, mention de macles de taille semblable. Seul *Combretum fruticosum* semble posséder des macles de grande taille mais ne dépassant pas 100 μm de diamètre (Van Vliet, 1979).

En somme, l'identification microscopique sur la poudre d'écorce de tige des deux échantillons a montré des caractéristiques communes. Ce qui confirme que l'échantillon de Dubréka et Kankan appartiennent à l'espèce *T. albida*.

V. Conclusion et perspectives

Le paludisme reste un problème de santé publique majeur au regard du nombre de cas et de décès. Bien que l'efficacité de la plupart des plantes médicinales reste non validée, leur utilisation dans la gestion des infections palustres est une tradition courante dans de nombreux pays en développement, notamment en Afrique.

Cette étude portant sur 3 plantes médicinales guinéennes dans le traitement du paludisme nous a permis d'aboutir aux résultats principaux suivants.

Le criblage biologique *in vitro* réalisé sur la souche PfK1 a permis de mettre en évidence que l'activité de *T. albida* varie selon la zone de récolte ($IC_{50} = 1,5$ à $8,5$ $\mu\text{g/ml}$).

R. minor et *D. velutinum* ont montré des activités non négligeables *in vitro* contre la souche PfK1 chloroquino-résistante avec des IC_{50} respectives de $14,38$ $\mu\text{g/ml}$ et $28,21$ $\mu\text{g/ml}$.

S'agissant des tests antipaludiques *in vivo* sur les modèles murins, les plantes les plus actives ont été *D. velutinum* et *T. albida* contre la souche *Plasmodium chabaudi* pour le paludisme simple avec une suppression de la densité parasitaire de 31% et 56% respectivement. Dans le modèle *P. berghei ANKA*, seul *T. albida* a été actif avec une diminution de la densité parasitaire de 61% à J8.

Pour *Terminalia albida*, nous avons noté une variation de l'activité *in vitro* et *in vivo* selon la zone de récolte avec une meilleure activité pour l'espèce récoltée dans la préfecture de Dubréka.

Les investigations réalisées sur les mécanismes d'action de *T. albida*, *in vivo* et *in vitro* dans des conditions inflammatoires, ont démontré la capacité de la plante à limiter le recrutement des lymphocytes T et l'expression des marqueurs pro-inflammatoires dans le cerveau des souris infectées par *P. berghei ANKA*. Ces propriétés anti-inflammatoires ont été confirmées *in vitro* dans un modèle inflammatoire non palustre. *T. albida* a également montré *in vitro* une capacité à piéger les espèces réactives de l'oxygène.

Par ailleurs, nous avons montré que les échantillons de *Terminalia albida*, selon leur provenance, ont des compositions phytochimiques différentes. L'analyse dérèplicative des extraits a permis d'identifier 38 composés chimiques, dont 15 étaient identiques aux deux échantillons, 9 produits uniquement identifiés dans l'échantillon de *T. albida* récolté dans la

V. Conclusion et perspectives

préfecture de Dubréka et 14 dans *T. albida* récolté dans la préfecture de Kankan. En outre, bien que l'identification microscopique des écorces de tige des deux échantillons présente des caractéristiques communes, l'aspect macroscopique a permis de fournir des éléments permettant de distinguer la provenance de *T. albida* dans notre étude.

En conclusion, ces résultats confirment l'effet antipaludique de *T. albida* et justifient son usage traditionnel en Guinée. Cependant, ces résultats méritent d'être poursuivis par des travaux permettant d'identifier plus précisément les molécules actives. Les activités anti-inflammatoires et antioxydantes de *T. albida* démontrées dans ce travail présentent également un intérêt pour la prise en charge de nombreuses pathologies, autres que le paludisme.

En ces temps de menace d'apparition de résistance aux antipaludiques actuels, il est important pour les pays endémiques de promouvoir et renforcer les ressources locales pour faciliter leur intégration dans le système de santé. Au vu de tout ce qui précède, la médecine traditionnelle doit être davantage explorée et valorisée pour la mise au point d'un médicament antipaludique efficace.

Références

- Abagli, A.Z., Alavo, T.B.C., Perez-Pacheco, R., and Platzer, E.G. (2019). Efficacy of the mermithid nematode, *Romanomermis iyengari*, for the biocontrol of *Anopheles gambiae*, the major malaria vector in sub-Saharan Africa. *Parasites & Vectors* *12*, 253.
- Abiodun, O.O., Rodríguez-Nogales, A., Algieri, F., Gomez-Caravaca, A.M., Segura-Carretero, A., Utrilla, M.P., Rodríguez-Cabezas, M.E., and Galvez, J. (2016). Antiinflammatory and immunomodulatory activity of an ethanolic extract from the stem bark of *Terminalia catappa* L. (Combretaceae): In vitro and in vivo evidences. *J Ethnopharmacol* *192*, 309–319.
- Achan, J., Talisuna, A.O., Erhart, A., Yeka, A., Tibenderana, J.K., Baliraine, F.N., Rosenthal, P.J., and D’Alessandro, U. (2011). Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. *Malar J* *10*, 144.
- Acharya, P., Garg, M., Kumar, P., Munjal, A., and Raja, K.D. (2017). Host–Parasite Interactions in Human Malaria: Clinical Implications of Basic Research. *Front. Microbiol.* *8*.
- Adebayo, J.O., and Krettli, A.U. (2011). Potential antimalarials from Nigerian plants: A review. *Journal of Ethnopharmacology* *133*, 289–302.
- Adebayo, J.O., Balogun, E.A., Malomo, S.O., Soladoye, A.O., Olatunji, L.A., Kolawole, O.M., Oguntoye, O.S., Babatunde, A.S., Akinola, O.B., Aguiar, A.C.C., et al. (2013). Antimalarial Activity of *Cocos nucifera* Husk Fibre: Further Studies.
- Agassounon Djikpo-Tchibozo, M., Karou, S.D., Sanon, S., Toukourou, F., and de Souza, C. (2010). In Vitro Antiplasmodial Properties of *Flacourtia flavescens* Willd. (Flacourtiaceae) and *Rytigynia canthioides* (Benth.) Robyns (Rubiaceae). *Afr J Tradit Complement Altern Med* *8*, 66–68.
- Agbodeka, K., Gbekley, H.E., Karou, S.D., Anani, K., Agbonon, A., Tchacondo, T., Batawila, K., Simpore, J., and Gbeassor, M. (2016). Ethnobotanical Study of Medicinal Plants Used for the Treatment of Malaria in the Plateau Region, Togo. *Pharmacognosy Res* *8*, S12–S18.
- Albsheer, M.M.A., Pestana, K., Ahmed, S., Elfaki, M., Gamil, E., Ahmed, S.M., Ibrahim, M.E., Musa, A.M., Lo, E., and Hamid, M.M.A. (2019). Distribution of Duffy Phenotypes among *Plasmodium vivax* Infections in Sudan. *Genes (Basel)* *10*.
- Al-Mayah, A.-R.A.A. (1983). The taxonomy of *Terminalia* (Combretaceae) and related genera. Ph.D. University of Leicester.
- Anchang-Kimbi, J.K., Achidi, E.A., Nkegoum, B., Mendimi, J.-M.N., Sverremark-Ekström, E., and Troye-Blomberg, M. (2016). IgG isotypic antibodies to crude *Plasmodium falciparum* blood-stage antigen associated with placental malaria infection in parturient Cameroonian women. *Afr Health Sci* *16*, 1007–1017.
- Anonymous 2018 Guinea - Country Profile - 2018 Consulté le 22/09/2019.
- Ansari, H.R., Templeton, T.J., Subudhi, A.K., Ramaprasad, A., Tang, J., Lu, F., Naeem, R., Hashish, Y., Oguike, M.C., Benavente, E.D., et al. (2016). Genome-scale comparison of expanded gene families in *Plasmodium ovale* wallikeri and *Plasmodium ovale* curtisi with

Plasmodium malariae and with other *Plasmodium* species. *International Journal for Parasitology* 46, 685–696.

Armah, H., Wired, E.K., Dodoo, A.K., Adjei, A.A., Tettey, Y., and Gyasi, R. (2005). Cytokines and adhesion molecules expression in the brain in human cerebral malaria. *Int J Environ Res Public Health* 2, 123–131.

Arora, G., Hart, G.T., Manzella-Lapeira, J., Doritchamou, J.Y., Narum, D.L., Thomas, L.M., Brzostowski, J., Rajagopalan, S., Doumbo, O.K., Traore, B., et al. (2018). NK cells inhibit *Plasmodium falciparum* growth in red blood cells via antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Elife* 7.

Artavanis-Tsakonas, K., and Riley, E.M. (2002). Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J. Immunol.* 169, 2956–2963.

Ashley, E.A., Dhorda, M., Fairhurst, R.M., Amaratunga, C., Lim, P., Suon, S., Sreng, S., Anderson, J.M., Mao, S., Sam, B., et al. (2014). Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N. Engl. J. Med.* 371, 411–423.

Ashley, E.A., Phyo, A.P., and Woodrow, C.J. (2018). Malaria. *The Lancet* 391, 1608–1621.

Attemene, S.D.D., Beourou, S., Tuo, K., Gnondjui, A.A., Konate, A., Toure, A.O., Kati-Coulibaly, S., and Djaman, J.A. (2018). Antiplasmodial activity of two medicinal plants against clinical isolates of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium berghei* infected mice. *J Parasit Dis* 42, 68–76.

Aucan, C., Traoré, Y., Tall, F., Nacro, B., Traoré-Leroux, T., Fumoux, F., and Rihet, P. (2000). High Immunoglobulin G2 (IgG2) and Low IgG4 Levels Are Associated with Human Resistance to *Plasmodium falciparum* Malaria. *Infect Immun* 68, 1252–1258.

Aucan, C., Traoré, Y., Fumoux, F., and Rihet, P. (2001). Familial Correlation of Immunoglobulin G Subclass Responses to *Plasmodium falciparum* Antigens in Burkina Faso. *Infect Immun* 69, 996–1001.

Banumathy, G., Singh, V., Pavithra, S.R., and Tatu, U. (2003). Heat shock protein 90 function is essential for *Plasmodium falciparum* growth in human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 278, 18336–18345.

Baratin, M., Roetynck, S., Pouvelle, B., Lemmers, C., Viebig, N.K., Johansson, S., Bierling, P., Scherf, A., Gysin, J., Vivier, E., et al. (2007). Dissection of the role of PfEMP1 and ICAM-1 in the sensing of *Plasmodium-falciparum*-infected erythrocytes by natural killer cells. *PLoS ONE* 2, e228.

Bardají, A., Sigauque, B., Sanz, S., Maixenchs, M., Ordi, J., Aponte, J.J., Mabunda, S., Alonso, P.L., and Menéndez, C. (2011). Impact of Malaria at the End of Pregnancy on Infant Mortality and Morbidity. *J Infect Dis* 203, 691–699.

Barrera, V., Haley, M.J., Strangward, P., Attree, E., Kamiza, S., Seydel, K.B., Taylor, T.E., Milner, D.A., Craig, A.G., and Couper, K.N. (2019). Comparison of CD8+ T Cell Accumulation in the Brain During Human and Murine Cerebral Malaria. *Front Immunol* 10.

- Bartoloni, A., and Zammarchi, L. (2012). CLINICAL ASPECTS OF UNCOMPLICATED AND SEVERE MALARIA. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases* 4, e2012026.
- Basir, R., Rahiman, S.F., Hasballah, K., Chong, W., Talib, H., Yam, M., Jabbarzare, M., Tie, T., Othman, F., Moklas, M., et al. (2012). *Plasmodium berghei ANKA* Infection in ICR Mice as a Model of Cerebral Malaria. *Iran J Parasitol* 7, 62–74.
- Becker, K., Tilley, L., Vennerstrom, J.L., Roberts, D., Rogerson, S., and Ginsburg, H. (2004). Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. *Int. J. Parasitol.* 34, 163–189.
- Beeson, J.G., Amin, N., Kanjala, M., and Rogerson, S.J. (2002). Selective Accumulation of Mature Asexual Stages of *Plasmodium falciparum*-Infected Erythrocytes in the Placenta. *Infect Immun* 70, 5412–5415.
- BEH (2019). Recommandations sanitaires 2019 pour les voyageurs (à l'attention des professionnels de santé). 83.
- Bennink, S., Kiesow, M.J., and Pradel, G. (2016). The development of malaria parasites in the mosquito midgut: Malaria parasite development in the mosquito midgut. *Cellular Microbiology* 18, 905–918.
- Benoit, M., Desnues, B., and Mege, J.-L. (2008). Macrophage Polarization in Bacterial Infections. *The Journal of Immunology* 181, 3733–3739.
- BenSaad, L.A., Kim, K.H., Quah, C.C., Kim, W.R., and Shahimi, M. (2017). Anti-inflammatory potential of ellagic acid, gallic acid and punicalagin A&B isolated from *Punica granatum*. *BMC Complement Altern Med* 17, 47.
- Bergmark, B., Bergmark, R., Beaudrap, P.D., Boum, Y., Mwanga-Amumpaire, J., Carroll, R., and Zapol, W. (2012). Inhaled nitric oxide and cerebral malaria: basis of a strategy for buying time for pharmacotherapy. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 31, e250-254.
- Berretta, F., Piccirillo, C.A., and Stevenson, M.M. (2019). *Plasmodium chabaudi* AS Infection Induces CD4+ Th1 Cells and Foxp3+T-bet+ Regulatory T Cells That Express CXCR3 and Migrate to CXCR3 Ligands. *Front Immunol* 10, 425.
- Berry, A., Iriart, X., and Magnaval, J.-F. (2009). Nouvelles méthodes de diagnostic du paludisme. *Revue Francophone des Laboratoires* 2009, 65–70.
- Bettelli, E., and Kuchroo, V.K. (2005). IL-12- and IL-23-induced T helper cell subsets. *J Exp Med* 201, 169–171.
- Bettioli, E., Carapau, D., Galan-Rodriguez, C., Ocaña-Morgner, C., and Rodriguez, A. (2010). Dual effect of *Plasmodium*-infected erythrocytes on dendritic cell maturation. *Malaria Journal* 9, 64.
- Bickel, G. (1951). Les origines de la quinine et ses applications en médecine.
- Bray, P.G., Ward, S.A., and O'Neill, P.M. (2005). Quinolines and artemisinin: chemistry, biology and history. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 295, 3–38.

- Brian de Souza, J., and Riley, E.M. (2002). Cerebral malaria: the contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis. *Microbes and Infection* 4, 291–300.
- Bruneel, F. (2019). Human cerebral malaria: 2019 mini review. *Rev. Neurol. (Paris)*.
- Bueno, L.L., Morais, C.G., Lacerda, M.V., Fujiwara, R.T., and Braga, É.M. (2012). Interleukin-17 producing T helper cells are increased during natural *Plasmodium vivax* infection. *Acta Tropica* 123, 53–57.
- Butler, N.S., Schmidt, N.W., and Harty, J.T. (2010). Differential effector pathways regulate memory CD8 T-cell immunity against *Plasmodium berghei* versus *Plasmodium yoelii* sporozoites. *J Immunol* 184, 2528–2538.
- Cabrales, P., Zanini, G.M., Meays, D., Frangos, J.A., and Carvalho, L.J.M. (2011). Nitric oxide protection against murine cerebral malaria is associated with improved cerebral microcirculatory physiology. *J. Infect. Dis.* 203, 1454–1463.
- Cahayani, W.A., Norahmawati, E., Budiarti, N., and Fitri, E. (2016). Increased CD11b and Hypoxia-Inducible Factors-1alpha Expressions in the Lung Tissue and Surfactant Protein-D Levels in Serum Are Related with Acute Lung Injury in Severe Malaria of C57BL/6 Mice. *Iran J Parasitol* 11, 13.
- Carroll, R.W., Wainwright, M.S., Kim, K.-Y., Kidambi, T., Gómez, N.D., Taylor, T., and Haldar, K. (2010). A Rapid Murine Coma and Behavior Scale for Quantitative Assessment of Murine Cerebral Malaria. *PLoS One* 5.
- Chandele, A., Mukerjee, P., Das, G., Ahmed, R., and Chauhan, V.S. (2011). Phenotypic and functional profiling of malaria-induced CD8 and CD4 T cells during blood-stage infection with *Plasmodium yoelii*. *Immunology* 132, 273.
- Chassagne, F., Haddad, M., Amiel, A., Phakeovilay, C., Manithip, C., Bourdy, G., Deharo, E., and Marti, G. (2018). A metabolomic approach to identify anti-hepatocarcinogenic compounds from plants used traditionally in the treatment of liver diseases. *Fitoterapia* 127, 226–236.
- Che, L.M., Niu, Y.X., Li, H.Z., and Chen, X.N. (2000). [Role of TNF-alpha and ICAM-1 in pathogenesis of cerebral malaria]. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi* 18, 138–140.
- Chen, C. (2014). Development of antimalarial drugs and their application in China: a historical review. *Infect Dis Poverty* 3, 9.
- Chotivanich, K., Silamut, K., and Day, N.P.J. (2007). Laboratory diagnosis of malaria infection – A short review of methods. 4.
- Chua, C.L.L., Brown, G., Hamilton, J.A., Rogerson, S., and Boeuf, P. (2013). Monocytes and macrophages in malaria: protection or pathology? *Trends Parasitol.* 29, 26–34.
- Clark, I.A., and Cowden, W.B. (2003). The pathophysiology of falciparum malaria. *Pharmacol Ther* 99, 221–260.

Références

- Claser, C., Malleret, B., Gun, S.Y., Wong, A.Y.W., Chang, Z.W., Teo, P., See, P.C.E., Howland, S.W., Ginhoux, F., and Rénia, L. (2011). CD8+ T Cells and IFN- γ Mediate the Time-Dependent Accumulation of Infected Red Blood Cells in Deep Organs during Experimental Cerebral Malaria. *PLoS ONE* 6, e18720.
- Collins, W.E., and Jeffery, G.M. (2005). *Plasmodium ovale*: Parasite and Disease. *Clin Microbiol Rev* 18, 570–581.
- Collins, W.E., and Jeffery, G.M. (2007). *Plasmodium malariae*: Parasite and Disease. *Clin Microbiol Rev* 20, 579–592.
- Collins, E., Vaselli, N.M., Sylla, M., Beavogui, A.H., Orsborne, J., Lawrence, G., Wiegand, R.E., Irish, S.R., Walker, T., and Messenger, L.A. (2019). The relationship between insecticide resistance, mosquito age and malaria prevalence in *Anopheles gambiae* s.l. from Guinea. *Sci Rep* 9, 1–12.
- Combes, V., Souza, J.B.D., Rénia, L., Hunt, N.H., and Grau, G.E. (2005). Cerebral malaria: Which parasite? Which model? *Drug Discovery Today: Disease Models* 2, 141–147.
- Conforti, F., Marcotullio, M.C., Menichini, F., Statti, G.A., Vannutelli, L., Burini, G., Menichini, F., and Curini, M. (2011). The influence of collection zone on glucosinolates, polyphenols and flavonoids contents and biological profiles of *Capparis sicula* ssp. *sicula*. *Food Sci Technol Int* 17, 87–97.
- Cooper, R.A., Ferdig, M.T., Su, X.-Z., Ursos, L.M.B., Mu, J., Nomura, T., Fujioka, H., Fidock, D.A., Roepe, P.D., and Wellems, T.E. (2002). Alternative mutations at position 76 of the vacuolar transmembrane protein PfCRT are associated with chloroquine resistance and unique stereospecific quinine and quinidine responses in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Pharmacol.* 61, 35–42.
- Couper, K.N., Blount, D.G., Wilson, M.S., Hafalla, J.C., Belkaid, Y., Kamanaka, M., Flavell, R.A., de Souza, J.B., and Riley, E.M. (2008). IL-10 from CD4+CD25–Foxp3–CD127–Adaptive Regulatory T Cells Modulates Parasite Clearance and Pathology during Malaria Infection. *PLoS Pathog* 4.
- Cowman, A.F., and Crabb, B.S. (2006). Invasion of Red Blood Cells by Malaria Parasites. *Cell* 124, 755–766.
- Cox-Singh, J., and Singh, B. (2008). Knowlesi malaria: newly emergent and of public health importance? *Trends Parasitol.* 24, 406–410.
- Craig, A., and Scherf, A. (2001). Molecules on the surface of the *Plasmodium falciparum* infected erythrocyte and their role in malaria pathogenesis and immune evasion. *Mol. Biochem. Parasitol.* 115, 129–143.
- Crutcher, J.M., Stevenson, M.M., Sedegah, M., and Hoffman, S.L. (1995). Interleukin-12 and malaria. *Research in Immunology* 146, 552–559.
- Cui, L., and Su, X. (2009). Discovery, mechanisms of action and combination therapy of artemisinin. *Expert Rev Anti Infect Ther* 7, 999–1013.

Références

- Cunningham, D.A., Lin, J., Brugat, T., Jarra, W., Tumwine, I., Kushinga, G., Ramesar, J., Franke-Fayard, B., and Langhorne, J. (2017). ICAM-1 is a key receptor mediating cytoadherence and pathology in the *Plasmodium chabaudi* malaria model. *Malar J* 16.
- Dalibon, P. (2016). Médicaments du paludisme. *Actualités Pharmaceutiques* 55, 40–45.
- Daniyan, M.O., and Ojo, O.T. (2019). In silico identification and evaluation of potential interaction of *Azadirachta indica* phytochemicals with *Plasmodium falciparum* heat shock protein 90. *J. Mol. Graph. Model.* 87, 144–164.
- Dantzer, K.W., and Jagannathan, P. (2018). $\gamma\delta$ T Cells in Antimalarial Immunity: New Insights Into Their Diverse Functions in Protection and Tolerance. *Front Immunol* 9.
- Dell'Agli, M., Parapini, S., Basilico, N., Verotta, L., Taramelli, D., Berry, C., and Bosisio, E. (2003). In vitro studies on the mechanism of action of two compounds with antiplasmodial activity: ellagic acid and 3,4,5-trimethoxyphenyl(6'-O-aalloyl)-beta-D-glucopyranoside. *Planta Med.* 69, 162–164.
- Depinay, N., Franetich, J.F., Grüner, A.C., Mauduit, M., Chavatte, J.-M., Luty, A.J.F., van Gemert, G.-J., Sauerwein, R.W., Siksik, J.-M., Hannoun, L., et al. (2011). Inhibitory Effect of TNF- α on Malaria Pre-Erythrocytic Stage Development: Influence of Host Hepatocyte/Parasite Combinations. *PLoS ONE* 6, e17464.
- Derick, S., Gironde, C., Perio, P., Reybier, K., Nepveu, F., Jauneau, A., and Furger, C. (2017). LUCS (Light-Up Cell System), a universal high throughput assay for homeostasis evaluation in live cells. *Sci Rep* 7, 18069.
- Deroost, K., Pham, T.-T., Opendakker, G., and Van den Steen, P.E. (2016). The immunological balance between host and parasite in malaria. *FEMS Microbiol Rev* 40, 208–257.
- deWalick, S., Amante, F.H., McSweeney, K.A., Randall, L.M., Stanley, A.C., Haque, A., Kuns, R.D., MacDonald, K.P.A., Hill, G.R., and Engwerda, C.R. (2007). Cutting Edge: Conventional Dendritic Cells Are the Critical APC Required for the Induction of Experimental Cerebral Malaria. *The Journal of Immunology* 178, 6033–6037.
- Dhar, R., Zhang, K., Talwar, G.P., Garg, S., and Nirbhay Kumar (1998). Inhibition of the growth and development of asexual and sexual stages of drug-sensitive and resistant strains of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* by Neem (*Azadirachta indica*) fractions. *Journal of Ethnopharmacology* 61, 31–39.
- Dodoo, D., Omer, F.M., Todd, J., Akanmori, B.D., Koram, K.A., and Riley, E.M. (2002). Absolute levels and ratios of proinflammatory and anti-inflammatory cytokine production in vitro predict clinical immunity to *Plasmodium falciparum* malaria. *J. Infect. Dis.* 185, 971–979.
- Dondorp, A.M., Nosten, F., Yi, P., Das, D., Phyto, A.P., Tarning, J., Lwin, K.M., Ariey, F., Hanpithakpong, W., Lee, S.J., et al. (2009). Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria. *New England Journal of Medicine* 361, 455–467.
- Doolan, D.L., Dobaño, C., and Baird, J.K. (2009). Acquired Immunity to Malaria. *Clin Microbiol Rev* 22, 13–36.

Références

- Dormeyer, M., Adams, Y., Kramer, B., Chakravorty, S., Tse, M.T., Pegoraro, S., Whittaker, L., Lanzer, M., and Craig, A. (2006). Rational design of anticytoadherence inhibitors for *Plasmodium falciparum* based on the crystal structure of human intercellular adhesion molecule 1. *Antimicrob. Agents Chemother.* *50*, 724–730.
- Dorosz, 2015 9782224033897: Guide pratique des médicaments Dorosz - AbeBooks - Collectif: 2224033893.
- Dorovini-Zis, K., Schmidt, K., Huynh, H., Fu, W., Whitten, R.O., Milner, D., Kamiza, S., Molyneux, M., and Taylor, T.E. (2011). The neuropathology of fatal cerebral malaria in malawian children. *Am. J. Pathol.* *178*, 2146–2158.
- Drugs, I. of M. (US) C. on the E. of A., Arrow, K.J., Panosian, C., and Gelband, H. (2004). *A Brief History of Malaria* (National Academies Press (US)).
- Dunst, J., Kamena, F., and Matuschewski, K. (2017). Cytokines and Chemokines in Cerebral Malaria Pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol* *7*, 324.
- DuPage, M., and Bluestone, J.A. (2016). Harnessing the plasticity of CD4+ T cells to treat immune-mediated disease. *Nature Reviews Immunology* *16*, 149–163.
- Durante Mangoni, E., Severini, C., Menegon, M., Romi, R., Ruggiero, G., and Majori, G. (2003). Case report: An unusual late relapse of *Plasmodium vivax* malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* *68*, 159–160.
- Durieux, M.-F. (2018). Diagnostic biologique du paludisme. *Actualités Pharmaceutiques* *57*, 25–29.
- EDS-MICS 2012 Enquête Démographique et de Santé et à Indicateurs Multiples (EDS-MICS) Consulté le 05/01/2020.
- Eeka, P., and Phanithi, P.B. (2018). Cytotoxic T Lymphocyte Granzyme-b mediates neuronal cell death during *Plasmodium berghei ANKA* induced experimental cerebral malaria. *Neurosci. Lett.* *664*, 58–65.
- Esu, E.B., Oringanje, C., and Meremikwu, M.M. (2019). Intermittent preventive treatment for malaria in infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews*.
- Fairhurst, R.M., and Dondorp, A.M. (2016). Artemisinin-Resistant *Plasmodium falciparum* Malaria. *Microbiol Spectr* *4*.
- Farimani, M.M., Khodaei, B., Moradi, H., Aliabadi, A., Ebrahimi, S.N., De Mieri, M., Kaiser, M., and Hamburger, M. (2018). Phytochemical Study of *Salvia leriifolia* Roots: Rearranged Abietane Diterpenoids with Antiprotozoal Activity. *J. Nat. Prod.* *81*, 1384–1390.
- Farrington, L., Vance, H., Rek, J., Prah, M., Jagannathan, P., Katureebe, A., Arinaitwe, E., Kanya, M.R., Dorsey, G., and Feeney, M.E. (2017). Both inflammatory and regulatory cytokine responses to malaria are blunted with increasing age in highly exposed children. *Malaria Journal* *16*, 499.
- Fayez, S., Feineis, D., Aké Assi, L., Kaiser, M., Brun, R., Awale, S., and Bringmann, G. (2018). Ancistrobrevines E-J and related naphthylisoquinoline alkaloids from the West African liana

Références

- Ancistrocladus abbreviatus with inhibitory activities against *Plasmodium falciparum* and PANC-1 human pancreatic cancer cells. *Fitoterapia* *131*, 245–259.
- Ferdig, M.T., Cooper, R.A., Mu, J., Deng, B., Joy, D.A., Su, X., and Wellems, T.E. (2004). Dissecting the loci of low-level quinine resistance in malaria parasites. *Mol. Microbiol.* *52*, 985–997.
- Fernandes, A.A.M., Carvalho, L.J. de M., Zanini, G.M., Ventura, A.M.R. da S., Souza, J.M., Cotias, P.M., Silva-Filho, I.L., and Daniel-Ribeiro, C.T. (2008). Similar cytokine responses and degrees of anemia in patients with *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections in the Brazilian Amazon region. *Clin. Vaccine Immunol.* *15*, 650–658.
- Figueiredo, M.M., Costa, P.A.C., Diniz, S.Q., Henriques, P.M., Kano, F.S., Tada, M.S., Pereira, D.B., Soares, I.S., Martins-Filho, O.A., Jankovic, D., et al. (2017). T follicular helper cells regulate the activation of B lymphocytes and antibody production during *Plasmodium vivax* infection. *PLOS Pathogens* *13*, e1006484.
- Franklin, B.S., Parroche, P., Ataíde, M.A., Lauw, F., Ropert, C., de Oliveira, R.B., Pereira, D., Tada, M.S., Nogueira, P., da Silva, L.H.P., et al. (2009). Malaria primes the innate immune response due to interferon-gamma induced enhancement of toll-like receptor expression and function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 5789–5794.
- Fred et al. 2012, A.C. Antipyretic and phytochemical evaluation of the ethanol extract of the leaves of *Desmodium velutinum*. *2*, 9.
- Fred-Jaiyesimi, A., and Oluwaseun Ogunlana, H. (2016). Comparative phytochemical studies and anti-inflammatory activities of *Desmodium velutinum* (Willd) and *Desmodium scorpiurus* Desv. (Family Papilionaceae) growing in Nigeria. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* *10*, 909–915.
- Fuchs, S., Nolan, T., and Crisanti, A. (2013). Mosquito transgenic technologies to reduce *Plasmodium* transmission. *Methods Mol. Biol.* *923*, 601–622.
- Gaillard, T., Madamet, M., and Pradines, B. (2015). Tetracyclines in malaria. *Malar J* *14*, 445.
- Garcia-Alvarez, M.-C., Moussa, I., Njomnang Soh, P., Nongonierma, R., Abdoulaye, A., Nicolau-Travers, M.-L., Fabre, A., Wdzieczak-Bakala, J., Ahond, A., Poupat, C., et al. (2013). Both plants *Sebastiania chamaelea* from Niger and *Chrozophora senegalensis* from Senegal used in African traditional medicine in malaria treatment share a same active principle. *Journal of Ethnopharmacology* *149*, 676–684.
- Gay, F., Zougbedé, S., N'dilimabaka, N., Rebollo, A., Mazier, D., and Moreno, A. (2012). Cerebral malaria: what is known and what is on research. *Rev. Neurol. (Paris)* *168*, 239–256.
- Gazzinelli, R.T., Kalantari, P., Fitzgerald, K.A., and Golenbock, D.T. (2014). Innate sensing of malaria parasites. *Nature Reviews Immunology* *14*, 744–757.
- Gething, P.W., Elyazar, I.R.F., Moyes, C.L., Smith, D.L., Battle, K.E., Guerra, C.A., Patil, A.P., Tatem, A.J., Howes, R.E., Myers, M.F., et al. (2012). A Long Neglected World Malaria Map: *Plasmodium vivax* Endemicity in 2010. *PLoS Neglected Tropical Diseases* *6*, e1814.

Références

- Gething, P.W., Casey, D.C., Weiss, D.J., Bisanzio, D., Bhatt, S., Cameron, E., Battle, K.E., Dalrymple, U., Rozier, J., Rao, P.C., et al. (2016). Mapping *Plasmodium falciparum* Mortality in Africa between 1990 and 2015. *New England Journal of Medicine* *375*, 2435–2445.
- Ghazanfari, N., Mueller, S.N., and Heath, W.R. (2018). Cerebral Malaria in Mouse and Man. *Front. Immunol.* *9*.
- Ghofrani, J., Lucar, O., Dugan, H., Reeves, R.K., and Jost, S. (2019). Semaphorin 7A modulates cytokine-induced memory-like responses by human natural killer cells. *Eur. J. Immunol.* *49*, 1153–1166.
- Gonzalez-Aseguinolaza, G., Van Kaer, L., Bergmann, C.C., Wilson, J.M., Schmieg, J., Kronenberg, M., Nakayama, T., Taniguchi, M., Koezuka, Y., and Tsuji, M. (2002). Natural Killer T Cell Ligand α -Galactosylceramide Enhances Protective Immunity Induced by Malaria Vaccines. *J Exp Med* *195*, 617–624.
- Goodman, C.D., Hoang, A.T., Diallo, D., Malterud, K.E., McFadden, G.I., and Wangenstein, H. (2019). Anti-plasmodial Effects of *Zanthoxylum zanthoxyloides*. *Planta Medica* *85*, 1073–1079.
- Götz, A., Tang, M.S., Ty, M.C., Arama, C., Ongoiba, A., Doumtabe, D., Traore, B., Crompton, P.D., Loke, P., and Rodriguez, A. (2017). Atypical activation of dendritic cells by *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *114*, E10568–E10577.
- Goudarzi, M., Mombeini, M.A., Fatemi, I., Aminzadeh, A., Kalantari, H., Nesari, A., Najafzadehvarzi, H., and Mehrzadi, S. (2019). Neuroprotective effects of Ellagic acid against acrylamide-induced neurotoxicity in rats. *Neurological Research* *41*, 419–428.
- Gowda, D.C., and Wu, X. (2018). Parasite Recognition and Signaling Mechanisms in Innate Immune Responses to Malaria. *Front Immunol* *9*.
- Gowda, N.M., Wu, X., Kumar, S., Febbraio, M., and Gowda, D.C. (2013). CD36 Contributes to Malaria Parasite-Induced Pro-Inflammatory Cytokine Production and NK and T Cell Activation by Dendritic Cells. *PLOS ONE* *8*, e77604.
- Graz, B., Willcox, M.L., Diakite, C., Falquet, J., Dackuo, F., Sidibe, O., Giani, S., and Diallo, D. (2010). Argemone mexicana decoction versus artesunate-amodiaquine for the management of malaria in Mali: policy and public-health implications. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* *104*, 33–41.
- Gregson, A., and Plowe, C.V. (2005). Mechanisms of resistance of malaria parasites to antifolates. *Pharmacol. Rev.* *57*, 117–145.
- Guermontprez, P., Helft, J., Claser, C., Deroubaix, S., Karanje, H., Gazumyan, A., Darrasse-Jeze, G., Telerman, S.B., Breton, G., Schreiber, H.A., et al. (2013). Inflammatory Flt3L is essential to mobilize dendritic cells and for T cell responses during *Plasmodium* infection. *Nat Med* *19*, 730–738.
- Gun, S.Y., Claser, C., Teo, T.H., Howland, S.W., Poh, C.M., Chye, R.R.Y., Ng, L.F.P., and Rénia, L. (2018). Interferon regulatory factor 1 is essential for pathogenic CD8+ T cell migration and retention in the brain during experimental cerebral malaria. *Cell. Microbiol.* *20*, e12819.

Références

- Gunalan, K., Niangaly, A., Thera, M.A., Doumbo, O.K., and Miller, L.H. (2018). *Plasmodium vivax* Infections of Duffy-Negative Erythrocytes: Historically Undetected or a Recent Adaptation? *Trends Parasitol.* *34*, 420–429.
- Haidara, M. (2018). Contribution à l'étude de l'activité pharmacologique de *Terminalia macroptera* Guill.et Perr. (Combretaceae) dans le but de l'élaboration d'un médicament traditionnel amélioré au Mali (Afrique de l'Ouest). thesis. Toulouse 3.
- Haidara, M., Bourdy, G., De Tommasi, N., Braca, A., Traore, K., Giani, S., and Sanogo, R. (2016). Medicinal Plants Used in Mali for the Treatment of Malaria and Liver Diseases. *Natural Product Communications* *11*, 1934578X1601100.
- Haidara, M., Haddad, M., Denou, A., Marti, G., Bourgeade-Delmas, S., Sanogo, R., Bourdy, G., and Aubouy, A. (2018). In vivo validation of anti-malarial activity of crude extracts of *Terminalia macroptera*, a Malian medicinal plant. *Malar. J.* *17*, 68.
- Hansen, D.S., Siomos, M.-A., Koning-Ward, T. de, Buckingham, L., Crabb, B.S., and Schofield, L. (2003). CD1d-restricted NKT cells contribute to malarial splenomegaly and enhance parasite-specific antibody responses. *European Journal of Immunology* *33*, 2588–2598.
- Haque, A., Best, S.E., Unosson, K., Amante, F.H., de Labastida, F., Anstey, N.M., Karupiah, G., Smyth, M.J., Heath, W.R., and Engwerda, C.R. (2011). Granzyme B expression by CD8+ T cells is required for the development of experimental cerebral malaria. *J. Immunol.* *186*, 6148–6156.
- Harbach, R.E. (2004). The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. *Bull. Entomol. Res.* *94*, 537–553.
- Harborne, J.B. (2001). Twenty-five years of chemical ecology. *Nat Prod Rep* *18*, 361–379.
- Hart, G.T., Tran, T.M., Theorell, J., Schlums, H., Arora, G., Rajagopalan, S., Sangala, A.D.J., Welsh, K.J., Traore, B., Pierce, S.K., et al. (2019). Adaptive NK cells in people exposed to *Plasmodium falciparum* correlate with protection from malaria. *J. Exp. Med.* *216*, 1280–1290.
- Hawkes, M., Elphinstone, R.E., Conroy, A.L., and Kain, K.C. (2013). Contrasting pediatric and adult cerebral malaria. *Virulence* *4*, 543–555.
- Hay, S.I., Sinka, M.E., Okara, R.M., Kabaria, C.W., Mbithi, P.M., Tago, C.C., Benz, D., Gething, P.W., Howes, R.E., Patil, A.P., et al. (2010). Developing Global Maps of the Dominant *Anopheles* Vectors of Human Malaria. *PLOS Medicine* *7*, e1000209.
- He, Z.D., Ma, C.Y., Tan, G.T., Sydara, K., Tamez, P., Southavong, B., Bouamanivong, S., Soejarto, D.D., Pezzuto, J.M., Fong, H.H., et al. (2006). Rourinoside and rouremin, antimalarial constituents from *Rourea minor*. *Phytochemistry* *67*, 1378–1384.
- Healer, J., Chiu, C.Y., and Hansen, D.S. (2018). Mechanisms of naturally acquired immunity to *P. falciparum* and approaches to identify merozoite antigen targets. *Parasitology* *145*, 839–847.

Références

- Hearn, J., Rayment, N., Landon, D.N., Katz, D.R., and de Souza, J.B. (2000). Immunopathology of cerebral malaria: morphological evidence of parasite sequestration in murine brain microvasculature. *Infect. Immun.* *68*, 5364–5376.
- Hernandez-Valladares, M., Naessens, J., Musoke, A.J., Sekikawa, K., Rihet, P., ole-MoiYoi, O.K., Busher, P., and Iraqi, F.A. (2006). Pathology of Tnf-deficient mice infected with *Plasmodium chabaudi adami* 408XZ. *Experimental Parasitology* *114*, 271–278.
- Horowitz, A., Newman, K.C., Evans, J.H., Korbel, D.S., Davis, D.M., and Riley, E.M. (2010). Cross-Talk between T Cells and NK Cells Generates Rapid Effector Responses to *Plasmodium falciparum*-Infected Erythrocytes. *The Journal of Immunology* *184*, 6043–6052.
- Howard, J., Loizon, S., Tyler, C.J., Duluc, D., Moser, B., Mechain, M., Duvignaud, A., Malvy, D., Troye-Blomberg, M., Moreau, J.-F., et al. (2017). The Antigen-Presenting Potential of V γ 9V δ 2 T Cells During *Plasmodium falciparum* Blood-Stage Infection. *J Infect Dis* *215*, 1569–1579.
- Howland, S.W., Claser, C., Poh, C.M., Gun, S.Y., and Rénia, L. (2015). Pathogenic CD8+ T cells in experimental cerebral malaria. *Semin Immunopathol* *37*, 221–231.
- Idro, R., Jenkins, N.E., and Newton, C.R. (2005). Pathogenesis, clinical features, and neurological outcome of cerebral malaria. *The Lancet Neurology* *4*, 827–840.
- Ikeda, M., Kaneko, M., Tachibana, S.-I., Balikagala, B., Sakurai-Yatsushiro, M., Yatsushiro, S., Takahashi, N., Yamauchi, M., Sekihara, M., Hashimoto, M., et al. (2018). Artemisinin-Resistant *Plasmodium falciparum* with High Survival Rates, Uganda, 2014-2016. *Emerging Infect. Dis.* *24*, 718–726.
- Imai, K., Tarumoto, N., Misawa, K., Runtuwene, L.R., Sakai, J., Hayashida, K., Eshita, Y., Maeda, R., Tuda, J., Murakami, T., et al. (2017). A novel diagnostic method for malaria using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and MinION™ nanopore sequencer. *BMC Infectious Diseases* *17*.
- Imai, T., Shen, J., Chou, B., Duan, X., Tu, L., Tetsutani, K., Moriya, C., Ishida, H., Hamano, S., Shimokawa, C., et al. (2010). Involvement of CD8+ T cells in protective immunity against murine blood-stage infection with *Plasmodium yoelii* 17XL strain. *Eur. J. Immunol.* *40*, 1053–1061.
- Imbert, P. (2003). Paludisme de l'enfant : critères de gravité. *Archives de Pédiatrie* *10*, s532–s538.
- Ing, R., and Stevenson, M.M. (2009). Dendritic cell and NK cell reciprocal cross talk promotes gamma interferon-dependent immunity to blood-stage *Plasmodium chabaudi AS* infection in mice. *Infect. Immun.* *77*, 770–782.
- Ishida, H., Matsuzaki-Moriya, C., Imai, T., Yanagisawa, K., Nojima, Y., Suzue, K., Hirai, M., Iwakura, Y., Yoshimura, A., Hamano, S., et al. (2010). Development of experimental cerebral malaria is independent of IL-23 and IL-17. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *402*, 790–795.
- Iyamah, P.C., and Idu, M. (2015). Ethnomedicinal survey of plants used in the treatment of malaria in Southern Nigeria. *J Ethnopharmacol* *173*, 287–302.

Références

- Jagannathan, P., Lutwama, F., Boyle, M.J., Nankya, F., Farrington, L.A., McIntyre, T.I., Bowen, K., Naluwu, K., Nalubega, M., Musinguzi, K., et al. (2017). V δ 2+ T cell response to malaria correlates with protection from infection but is attenuated with repeated exposure. *Sci Rep* 7, 1–12.
- Jansen, O., Angenot, L., Tits, M., Nicolas, J.P., De Mol, P., Nikiéma, J.-B., and Frédérick, M. (2010). Evaluation of 13 selected medicinal plants from Burkina Faso for their antiplasmodial properties. *J Ethnopharmacol* 130, 143–150.
- Jansen, O., Tchinda, A.T., Loua, J., Esters, V., Cieckiewicz, E., Ledoux, A., Toukam, P.D., Angenot, L., Tits, M., Balde, A.M., et al. (2017). Antiplasmodial activity of *Mezoneuron benthamianum* leaves and identification of its active constituents. *J Ethnopharmacol* 203, 20–26.
- Jayesh, K., Helen, L.R., Vysakh, A., Binil, E., and Latha, M.S. (2017). In vivo toxicity evaluation of aqueous acetone extract of *Terminalia bellirica* (Gaertn.) Roxb. fruit. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 86, 349–355.
- Jullien, 2012, V. Pharmacocinétique des antipaludiques. 5.
- Kamareddine, L. (2012). The Biological Control of the Malaria Vector. *Toxins (Basel)* 4, 748–767.
- Kamya, M.R., Yeka, A., Bukirwa, H., Lugemwa, M., Rwakimari, J.B., Staedke, S.G., Talisuna, A.O., Greenhouse, B., Nosten, F., Rosenthal, P.J., et al. (2007). Artemether-lumefantrine versus dihydroartemisinin-piperazine for treatment of malaria: a randomized trial. *PLoS Clin Trials* 2, e20.
- Kavishe, R.A., Koenderink, J.B., and Alifrangis, M. (2017). Oxidative stress in malaria and artemisinin combination therapy: Pros and Cons. *FEBS J.* 284, 2579–2591.
- Kawai, T., and Akira, S. (2011). Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity* 34, 637–650.
- Keswani, T., Sarkar, S., Sengupta, A., and Bhattacharyya, A. (2016). Role of TGF- β and IL-6 in dendritic cells, Treg and Th17 mediated immune response during experimental cerebral malaria. *Cytokine* 88, 154–166.
- Kim, S.H., Nam, M.-H., Roh, K.H., Park, H.C., Nam, D.H., Park, G.H., Han, E.T., Klein, T.A., and Lim, C.S. (2008). Evaluation of a rapid diagnostic test specific for *Plasmodium vivax*. *Trop. Med. Int. Health* 13, 1495–1500.
- King, T., and Lamb, T. (2015). Interferon- γ : The Jekyll and Hyde of Malaria. *PLoS Pathog* 11.
- Knight, D.J., and Peters, W. (1980). The antimalarial activity of N-benzyloxydihydrotriazines. I. The activity of clociguanil (BRL 50216) against rodent malaria, and studies on its mode of action. *Ann Trop Med Parasitol* 74, 393–404.
- Kolodziej, H., Burmeister, A., Trun, W., Radtke, O.A., Kiderlen, A.F., Ito, H., Hatano, T., Yoshida, T., and Foo, L.Y. (2005). Tannins and related compounds induce nitric oxide synthase and cytokines gene expressions in *Leishmania major*-infected macrophage-like RAW 264.7 cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 13, 6470–6476.

- Komlaga, G., Agyare, C., Dickson, R.A., Mensah, M.L.K., Annan, K., Loiseau, P.M., and Champy, P. (2015). Medicinal plants and finished marketed herbal products used in the treatment of malaria in the Ashanti region, Ghana. *Journal of Ethnopharmacology* *172*, 333–346.
- Komlaga, G., Cojean, S., Dickson, R.A., Beniddir, M.A., Suyyagh-Albouz, S., Mensah, M.L.K., Agyare, C., Champy, P., and Loiseau, P.M. (2016). Antiplasmodial activity of selected medicinal plants used to treat malaria in Ghana. *Parasitology Research* *115*, 3185–3195.
- Kossodo, S., Monso, C., Juillard, P., Velu, T., Goldman, M., and Grau, G.E. (1997). Interleukin-10 modulates susceptibility in experimental cerebral malaria. *Immunology* *91*, 536–540.
- Kumar, A., Singh, K.P., Bali, P., Anwar, S., Kaul, A., Singh, O.P., Gupta, B.K., Kumari, N., Noor Alam, Md., Raziuddin, M., et al. (2018). iNOS polymorphism modulates iNOS/NO expression via impaired antioxidant and ROS content in *P. vivax* and *P. falciparum* infection. *Redox Biology* *15*, 192–206.
- Kumsiri, R., Troye-Blomberg, M., Pattanapanyasat, K., Krudsood, S., and Maneerat, Y. (2016). IgE low affinity receptor (CD23) expression, *Plasmodium falciparum* specific IgE and tumor necrosis factor-alpha production in Thai uncomplicated and severe falciparum malaria patients. *Acta Tropica* *154*, 25–33.
- Kurtis, J.D., Mtalib, R., Onyango, F.K., and Duffy, P.E. (2001). Human resistance to *Plasmodium falciparum* increases during puberty and is predicted by dehydroepiandrosterone sulfate levels. *Infect. Immun.* *69*, 123–128.
- Kwenti, T.E., Kukwah, T.A., Kwenti, T.D.B., Nyassa, B.R., Dilonga, M.H., Enow-Orock, G., Tendongfor, N., Anong, N.D., Wanji, S., Njunda, L.A., et al. (2019). Comparative analysis of IgG and IgG subclasses against *Plasmodium falciparum* MSP-119 in children from five contrasting bioecological zones of Cameroon. *Malar J* *18*.
- Kwiatkowski, D. (1990). Tumour necrosis factor, fever and fatality in *falciparum* malaria. *Immunology Letters* *25*, 213–216.
- Lacroix, R., Mukabana, W.R., Gouagna, L.C., and Koella, J.C. (2005). Malaria infection increases attractiveness of humans to mosquitoes. *PLoS Biol.* *3*, e298.
- Lamb, A.F.A., and Ntima, O.O. (1971). *Terminalia ivorensis*.
- Langhorne, J. (1989). The role of CD4+ T-cells in the immune response to *Plasmodium chabaudi*. *Parasitology Today* *5*, 362–364.
- Laryea, M.K., and Borquaye, L.S. (2019). Antimalarial Efficacy and Toxicological Assessment of Extracts of Some Ghanaian Medicinal Plants. *Journal of Parasitology Research* *2019*, 1–9.
- Leang, R., Canavati, S.E., Khim, N., Vestergaard, L.S., Borghini Fuhrer, I., Kim, S., Denis, M.B., Heng, P., Tol, B., Huy, R., et al. (2016). Efficacy and Safety of Pyronaridine-Artesunate for Treatment of Uncomplicated *Plasmodium falciparum* Malaria in Western Cambodia. *Antimicrob Agents Chemother* *60*, 3884–3890.
- Lennartz, F., Adams, Y., Bengtsson, A., Olsen, R.W., Turner, L., Ndam, N.T., Ecklu-Mensah, G., Moussiliou, A., Ofori, M.F., Gamain, B., et al. (2017). Structure-Guided Identification of a

Family of Dual Receptor-Binding PfEMP1 that Is Associated with Cerebral Malaria. *Cell Host Microbe* 21, 403–414.

Li, C., Sanni, L.A., Omer, F., Riley, E., and Langhorne, J. (2003). Pathology of *Plasmodium chabaudi chabaudi* Infection and Mortality in Interleukin-10-Deficient Mice Are Ameliorated by Anti-Tumor Necrosis Factor Alpha and Exacerbated by Anti-Transforming Growth Factor β Antibodies. *Infect Immun* 71, 4850–4856.

Liu, T., Zhang, L., Joo, D., and Sun, S.-C. (2017). NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther* 2, 17023.

Looareesuwan, S., Krudsood, S., Sloan, L., Swan, H., Rosenblatt, J., Leowattana, W., Muyombwe, A., Wilairatana, P., and Chavalitsheewinkoon-Petmitr, P. (2005). Evaluation of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of malaria in patients from thailand. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 73, 850–854.

Lou, J., Lucas, R., and Grau, G.E. (2001). Pathogenesis of cerebral malaria: recent experimental data and possible applications for humans. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 810–820, table of contents.

Loua, J., Traore, M.S., Camara, A., Balde, M.A., Maes, L., Pieters, L., and Balde, A.M. (2017). Biological and Phytochemical Investigations on *Caesalpinia benthamiana*, a Plant Traditionally Used as Antimalarial in Guinea. *Evid Based Complement Alternat Med* 2017, 9438607.

Lu, F., Culleton, R., Zhang, M., Ramaprasad, A., von Seidlein, L., Zhou, H., Zhu, G., Tang, J., Liu, Y., Wang, W., et al. (2017). Emergence of Indigenous Artemisinin-Resistant *Plasmodium falciparum* in Africa. *N. Engl. J. Med.* 376, 991–993.

Lundie, R.J., Young, L.J., Davey, G.M., Villadangos, J.A., Carbone, F.R., Heath, W.R., and Crabb, B.S. (2010). Blood-stage *Plasmodium berghei* infection leads to short-lived parasite-associated antigen presentation by dendritic cells. *European Journal of Immunology* 40, 1674–1681.

Ly, A., and Hansen, D.S. (2019). Development of B Cell Memory in Malaria. *Front Immunol* 10.

Ma, X., Zheng, C., Hu, C., Rahman, K., and Qin, L. (2011). The genus *Desmodium* (Fabaceae)-traditional uses in Chinese medicine, phytochemistry and pharmacology. *J Ethnopharmacol* 138, 314–332.

Maier, A.G., Cooke, B.M., Cowman, A.F., and Tilley, L. (2009). Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 341–354.

Malaguarnera, L., Imbesi, R.M., Pignatelli, S., Simporè, J., Malaguarnera, M., and Musumeci, S. (2002). Increased levels of interleukin-12 in *Plasmodium falciparum* malaria: correlation with the severity of disease. *Parasite Immunol.* 24, 387–389.

Malebo, H.M., Tanja, W., Cal, M., Swaleh, S. a. M., Omolo, M.O., Hassanali, A., Séquin, U., Hamburger, M., Brun, R., and Ndiege, I.O. (2009). Antiplasmodial, anti-trypanosomal, anti-leishmanial and cytotoxicity activity of selected Tanzanian medicinal plants. *Tanzan J Health Res* 11, 226–234.

Références

- Maneerat, Y., Viriyavejakul, P., Punpoowong, B., Jones, M., Wilairatana, P., Pongponratn, E., Turner, G.D., and Udomsangpetch, R. (2000). Inducible nitric oxide synthase expression is increased in the brain in fatal cerebral malaria. *Histopathology* 37, 269–277.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology* 25, 677–686.
- Martins, T.M., Domingos, A., Berry, C., and Wyatt, D.M. (2006). The activity and inhibition of the food vacuole plasmepsin from the rodent malaria parasite *Plasmodium chabaudi*. *Acta Tropica* 97, 212–218.
- Mastelic, B., do Rosario, A.P.F., Veldhoen, M., Renauld, J.C., Jarra, W., Sponaas, A.-M., Roetyncck, S., Stockinger, B., and Langhorne, J. (2012). IL-22 Protects Against Liver Pathology and Lethality of an Experimental Blood-Stage Malaria Infection. *Front Immunol* 3.
- Matiya, D.J., Philbert, A.B., Kidima, W., and Matowo, J.J. (2019). Dynamics and monitoring of insecticide resistance in malaria vectors across mainland Tanzania from 1997 to 2017: a systematic review. *Malaria Journal* 18.
- McCall, M.B.B., and Sauerwein, R.W. (2010). Interferon- γ —central mediator of protective immune responses against the pre-erythrocytic and blood stage of malaria. *Journal of Leukocyte Biology* 88, 1131–1143.
- McCall, M.B.B., Roestenberg, M., Ploemen, I., Teirlinck, A., Hopman, J., Mast, Q. de, Dolo, A., Doumbo, O.K., Luty, A., Ven, A.J.A.M. van der, et al. (2010). Memory-like IFN- γ response by NK cells following malaria infection reveals the crucial role of T cells in NK cell activation by *P. falciparum*. *European Journal of Immunology* 40, 3472–3477.
- McGilvray, I.D., Serghides, L., Kapus, A., Rotstein, O.D., and Kain, K.C. (2000). Nonopsonic monocyte/macrophage phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-parasitized erythrocytes: a role for CD36 in malarial clearance. *Blood* 96, 3231–3240.
- McNab, F., Mayer-Barber, K., Sher, A., Wack, A., and O’Garra, A. (2015). Type I interferons in infectious disease. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 87–103.
- Menendez, C. (1995). Malaria during pregnancy: a priority area of malaria research and control. *Parasitol. Today (Regul. Ed.)* 11, 178–183.
- Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., and Mortha, A. (2013). The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting. *Annual Review of Immunology* 31.
- Meshnick, S.R. (2002). Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity. *International Journal for Parasitology* 32, 1655–1660.
- Millar, S.B., and Cox-Singh, J. (2015). Human infections with *Plasmodium knowlesi*—zoonotic malaria. *Clinical Microbiology and Infection* 21, 640–648.
- Miller, L.H., Mason, S.J., Clyde, D.F., and McGinniss, M.H. (1976). The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. *N. Engl. J. Med.* 295, 302–304.

Références

Ministère des Affaires étrangères 2019, M. de l'Europe et des A. Présentation de la Guinée. Consulté le 22/09/2019.

Miriyala, S., Chandra, M., Maxey, B., Day, A., St. Clair, D.K., and Panchatcharam, M. (2015). Arjunolic acid ameliorates reactive oxygen species via inhibition of p47 phox -serine phosphorylation and mitochondrial dysfunction. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 68, 70–77.

Mitchell, A.J., Hansen, A.M., Hee, L., Ball, H.J., Potter, S.M., Walker, J.C., and Hunt, N.H. (2005). Early Cytokine Production Is Associated with Protection from Murine Cerebral Malaria. *Infection and Immunity* 73, 5645–5653.

Mittal, M., Siddiqui, M.R., Tran, K., Reddy, S.P., and Malik, A.B. (2013). Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. *Antioxidants & Redox Signaling* 20, 1126–1167.

Mohan, K., and Stevenson, M.M. (1998). Interleukin-12 corrects severe anemia during blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS in susceptible A/J mice. *Exp. Hematol.* 26, 45–52.

Mohan, K., Moulin, P., and Stevenson, M.M. (1997). Natural killer cell cytokine production, not cytotoxicity, contributes to resistance against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection. *J. Immunol.* 159, 4990–4998.

Moody, A. (2002). Rapid Diagnostic Tests for Malaria Parasites. *Clin Microbiol Rev* 15, 66–78.

Morrot, A., and Zavala, F. (2004). Regulation of the CD8+ T cell responses against *Plasmodium* liver stages in mice. *International Journal for Parasitology* 34, 1529–1534.

Mosser, D.M., and Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8, 958–969.

Muganga, R., Angenot, L., Tits, M., and Frédérick, M. (2010). Antiplasmodial and cytotoxic activities of Rwandan medicinal plants used in the treatment of malaria. *J Ethnopharmacol* 128, 52–57.

Muganga, R., Angenot, L., Tits, M., and Frédérick, M. (2014). In vitro and in vivo antiplasmodial activity of three Rwandan medicinal plants and identification of their active compounds. *Planta Med.* 80, 482–489.

Müller, K., Gibbins, M.P., Matuschewski, K., and Hafalla, J.C.R. (2017). Evidence of cross-stage CD8+ T cell epitopes in malaria pre-erythrocytic and blood stage infections. *Parasite Immunol.* 39.

Muñoz, V., Sauvain, M., Bourdy, G., Callapa, J., Rojas, I., Vargas, L., Tae, A., and Deharo, E. (2000). The search for natural bioactive compounds through a multidisciplinary approach in Bolivia. Part II. Antimalarial activity of some plants used by Mosekene indians. *Journal of Ethnopharmacology* 69, 139–155.

Namazi, M.J., and Phillips, R.S. (2010). Immune Responses of NIH Mice Infected with Avirulent and Virulent Strains of *Plasmodium chabaudi adami* Single and Mixed Infections. *Korean J Parasitol* 48, 23–33.

Références

- Naß, J., and Efferth, T. (2019). Development of artemisinin resistance in malaria therapy. *Pharmacol. Res.* 104275.
- Ndjonka, D., Bergmann, B., Agyare, C., Zimbres, F.M., Lüersen, K., Hensel, A., Wrenger, C., and Liebau, E. (2012). In vitro activity of extracts and isolated polyphenols from West African medicinal plants against *Plasmodium falciparum*. *Parasitol. Res.* 111, 827–834.
- Nebl, T., De Veer, M.J., and Schofield, L. (2005). Stimulation of innate immune responses by malarial glycosylphosphatidylinositol via pattern recognition receptors. *Parasitology* 130 *Suppl.*, S45-62.
- Newman, D.J., and Cragg, G.M. (2016). Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* 79, 629–661.
- Newton, C.R., Taylor, T.E., and Whitten, R.O. (1998). Pathophysiology of fatal *falciparum* malaria in African children. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58, 673–683.
- Nganou-Makamdop, K., van Gemert, G.-J., Arens, T., Hermsen, C.C., and Sauerwein, R.W. (2012). Long Term Protection after Immunization with *P. berghei* Sporozoites Correlates with Sustained IFN γ Responses of Hepatic CD8+ Memory T Cells. *PLoS One* 7.
- Nielsen, C.M., Wolf, A.-S., Goodier, M.R., and Riley, E.M. (2016). Synergy between Common γ Chain Family Cytokines and IL-18 Potentiates Innate and Adaptive Pathways of NK Cell Activation. *Front. Immunol.* 7.
- Njomnang Soh, P., Witkowski, B., Gales, A., Huyghe, E., Berry, A., Pipy, B., and Benoit-Vical, F. (2012). Implication of glutathione in the in vitro antiplasmodial mechanism of action of ellagic acid. *PLoS ONE* 7, e45906.
- Nsanzabana, C. (2019). Resistance to Artemisinin Combination Therapies (ACTs): Do Not Forget the Partner Drug! *Trop Med Infect Dis* 4.
- Nuchsongsin, F., Chotivanich, K., Charunwatthana, P., Omodeo-Salè, F., Fausta, O.-S., Taramelli, D., Day, N.P., White, N.J., and Dondorp, A.M. (2007). Effects of malaria heme products on red blood cell deformability. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77, 617–622.
- Nunes-Alves, C. (2015). Parasite physiology: RIFINs promote rosette formation during malaria. *Nature Reviews Microbiology* 13, 250–250.
- Oakley, M.S., Gerald, N., McCutchan, T.F., Aravind, L., and Kumar, S. (2011). Clinical and molecular aspects of malaria fever. *Trends in Parasitology* 27, 442–449.
- Oakley, M.S., Sahu, B.R., Lotspeich-Cole, L., Solanki, N.R., Majam, V., Pham, P.T., Banerjee, R., Kozakai, Y., Derrick, S.C., Kumar, S., et al. (2013). The transcription factor T-bet regulates parasitemia and promotes pathogenesis during *Plasmodium berghei* ANKA murine malaria. *J. Immunol.* 191, 4699–4708.
- Ocaña-Morgner, C., Mota, M.M., and Rodriguez, A. (2003). Malaria Blood Stage Suppression of Liver Stage Immunity by Dendritic Cells. *J Exp Med* 197, 143–151.
- OECD, 2008 OECD guidelines for the testing of chemicals, Section 4: health effects. Test no. 425: acute oral toxicity: up-and-down procedure. Paris: OECD Publishing.

Références

- Olagnier, D., Lavergne, R.-A., Meunier, E., Lefèvre, L., Dardenne, C., Aubouy, A., Benoit-Vical, F., Ryffel, B., Coste, A., Berry, A., et al. (2011). Nr1h2, a PPAR γ Alternative Pathway to Promote CD36 Expression on Inflammatory Macrophages: Implication for Malaria. *PLOS Pathogens* 7, e1002254.
- Omer, F.M., and Riley, E.M. (1998). Transforming Growth Factor β Production Is Inversely Correlated with Severity of Murine Malaria Infection. *J Exp Med* 188, 39–48.
- Omonkhua, A.A., Cyril-Olutayo, M.C., Akanbi, O.M., and Adebayo, O.A. (2013). Antimalarial, hematological, and antioxidant effects of methanolic extract of *Terminalia avicennioides* in *Plasmodium berghei*-infected mice. *Parasitol. Res.* 112, 3497–3503.
- OMS, (2011). OMS | Traitement préventif intermittent chez les nourrissons (TPIIn). Consulté le 06/12/2019.
- OMS, (2012). OMS | Traitement préventif intermittent du paludisme (TPI) pour les femmes enceintes. Consulté le 09/12/2019.
- OMS (2014). Rapport 2014 sur le paludisme dans le monde - résumé. 28.
- OMS, (2018b). OMS | Traitement du paludisme simple - tour d'horizon. Consulté le 12/12/2019.
- OMS, 2000 Principes méthodologiques généraux pour la recherche et l'évaluation relatives à la médecine traditionnelle. 87.
- OMS, 2013 Entomologie du paludisme et lutte antivectorielle. - Consulté le 20/08/2019.
- OMS, 2017 Rapport Biennal 2016-17 OMS Guinée. Consulté le 23/09/2019.
- OMS, 2018a Le Rapport sur le paludisme dans le monde 2018 fournit un état des lieux complet des progrès réalisés au niveau mondial en matière de lutte contre le paludisme jusque fin 2017. Consulté le 22/07/2019.
- Organization, W.H., and Mediterranean, R.O. for the E. (2002). The WHO strategy for traditional medicine: Review of the global situation and strategy implementation in the Eastern Mediterranean Region.
- Osier, F.H., Feng, G., Boyle, M.J., Langer, C., Zhou, J., Richards, J.S., McCallum, F.J., Reiling, L., Jaworowski, A., Anders, R.F., et al. (2014). Opsonic phagocytosis of *Plasmodium falciparum* merozoites: mechanism in human immunity and a correlate of protection against malaria. *BMC Med* 12, 108.
- Ouattara, L.P., Sanon, S., Mahiou-Leddet, V., Gansané, A., Baghdikian, B., Traoré, A., Nébié, I., Traoré, A.S., Azas, N., Ollivier, E., et al. (2014). In vitro antiplasmodial activity of some medicinal plants of Burkina Faso. *Parasitol. Res.* 113, 405–416.
- Ouji, M., Augereau, J.-M., Paloque, L., and Benoit-Vical, F. (2018). *Plasmodium falciparum* resistance to artemisinin-based combination therapies: A sword of Damocles in the path toward malaria elimination. *Parasite* 25, 24.

- Oyong, D.A., Wilson, D.W., Barber, B.E., William, T., Jiang, J., Galinski, M.R., Fowkes, F.J.I., Grigg, M.J., Beeson, J.G., Anstey, N.M., et al. (2019). Induction and kinetics of complement-fixing antibodies against *Plasmodium vivax* MSP3 α and relationship with IgG subclasses and IgM. *J. Infect. Dis.*
- Pages, F., Orlandi-Pradines, E., and Corbel, V. (2007). Vecteurs du paludisme: biologie, diversité, contrôle et protection individuelle. /data/revues/0399077X/00370003/06002964/.
- Pain, A., Ferguson, D.J.P., Kai, O., Urban, B.C., Lowe, B., Marsh, K., and Roberts, D.J. (2001). Platelet-mediated clumping of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes is a common adhesive phenotype and is associated with severe malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1805–1810.
- Pandey, A.V., Bisht, H., Babbarwal, V.K., Srivastava, J., Pandey, K.C., and Chauhan, V.S. (2001). Mechanism of malarial haem detoxification inhibition by chloroquine. *Biochem J* 355, 333–338.
- Parmar, R., Patel, H., Yadav, N., Parikh, R., Patel, K., Mohankrishnan, A., Bhurani, V., Joshi, U., and Dalai, S.K. (2018). Infectious Sporozoites of *Plasmodium berghei* Effectively Activate Liver CD8 α + Dendritic Cells. *Front. Immunol.* 9.
- Patel, S.N., Serghides, L., Smith, T.G., Febbraio, M., Silverstein, R.L., Kurtz, T.W., Pravenec, M., and Kain, K.C. (2004). CD36 mediates the phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes by rodent macrophages. *J. Infect. Dis.* 189, 204–213.
- Patil, P.R., Gemma, S., Campiani, G., and Craig, A.G. (2011). Broad inhibition of *Plasmodium falciparum* cytoadherence by (+)-epigallocatechin gallate. *Malar. J.* 10, 348.
- Penha-Gonçalves, C. (2019). Genetics of Malaria Inflammatory Responses: A Pathogenesis Perspective. *Front. Immunol.* 10.
- Percário, S., Moreira, D.R., Gomes, B.A.Q., Ferreira, M.E.S., Gonçalves, A.C.M., Laurindo, P.S.O.C., Vilhena, T.C., Dolabela, M.F., and Green, M.D. (2012). Oxidative stress in malaria. *Int J Mol Sci* 13, 16346–16372.
- Pereira, M.L.M., Marinho, C.R.F., and Epiphanyo, S. (2018). Could Heme Oxygenase-1 Be a New Target for Therapeutic Intervention in Malaria-Associated Acute Lung Injury/Acute Respiratory Distress Syndrome? *Front Cell Infect Microbiol* 8.
- Pérez-Mazliah, D., Ng, D.H.L., Freitas do Rosário, A.P., McLaughlin, S., Mastelic-Gavillet, B., Sodenkamp, J., Kushinga, G., and Langhorne, J. (2015). Disruption of IL-21 signaling affects T cell-B cell interactions and abrogates protective humoral immunity to malaria. *PLoS Pathog.* 11, e1004715.
- Pervin, M., Unno, K., Nakagawa, A., Takahashi, Y., Iguchi, K., Yamamoto, H., Hoshino, M., Hara, A., Takagaki, A., Nanjo, F., et al. (2017). Blood brain barrier permeability of (-)-epigallocatechin gallate, its proliferation-enhancing activity of human neuroblastoma SH-SY5Y cells, and its preventive effect on age-related cognitive dysfunction in mice. *Biochem Biophys Rep* 9, 180–186.
- Petersen, I., Eastman, R., and Lanzer, M. (2011). Drug-resistant malaria: Molecular mechanisms and implications for public health. *FEBS Letters* 585, 1551–1562.

PHARMACOPÉE EUROPÉENNE 9ème édition. ed, 2017.

Phyo, A.P., Ashley, E.A., Anderson, T.J.C., Bozdech, Z., Carrara, V.I., Sriprawat, K., Nair, S., White, M.M., Dziekan, J., Ling, C., et al. (2016). Declining Efficacy of Artemisinin Combination Therapy Against *P. falciparum* Malaria on the Thai-Myanmar Border (2003-2013): The Role of Parasite Genetic Factors. *Clin. Infect. Dis.* *63*, 784–791.

Pichyangkul, S., Saengkrai, P., Yongvanitchit, K., Stewart, A., and Heppner, D.G. (1997). Activation of gammadelta T cells in malaria: interaction of cytokines and a schizont-associated *Plasmodium falciparum* antigen. *J. Infect. Dis.* *176*, 233–241.

Piva, L., Tetlak, P., Claser, C., Karjalainen, K., Renia, L., and Ruedl, C. (2012). Cutting edge: Clec9A+ dendritic cells mediate the development of experimental cerebral malaria. *J. Immunol.* *189*, 1128–1132.

Poh, C.M., and Rénia, L. (2015). Activated Brain Endothelial Cells Cross-Present Malaria Antigen. *PLoS Pathog.* *11*, e1004963.

Poh, C.M., Howland, S.W., Grotenbreg, G.M., and Rénia, L. (2014). Damage to the Blood-Brain Barrier during Experimental Cerebral Malaria Results from Synergistic Effects of CD8⁺ T Cells with Different Specificities. *Infection and Immunity* *82*, 4854–4864.

Porcherie, A., Mathieu, C., Peronet, R., Schneider, E., Claver, J., Commere, P.-H., Kiefer-Biasizzo, H., Karasuyama, H., Milon, G., Dy, M., et al. (2011). Critical role of the neutrophil-associated high-affinity receptor for IgE in the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *J Exp Med* *208*, 2225–2236.

Pussard, E., and Verdier, F. (1994). Antimalarial 4-aminoquinolines: mode of action and pharmacokinetics. *Fundamental & Clinical Pharmacology* *8*, 1–17.

Qin, M., Wang, L., Li, F., Yang, M., Song, L., Tian, F., Yukht, A., Shah, P.K., Rothenberg, M.E., and Sharifi, B.G. (2017). Oxidized LDL activated eosinophil polarize macrophage phenotype from M2 to M1 through activation of CD36 scavenger receptor. *Atherosclerosis* *263*, 82–91.

Reddy, M., Gupta, S., Jacob, M., Khan, S., and Ferreira, D. (2007). Antioxidant, Antimalarial and Antimicrobial Activities of Tannin-Rich Fractions, Ellagitannins and Phenolic Acids from *Punica granatum* L. *Planta Medica* *73*, 461–467.

Reece, W.H.H., Pinder, M., Gothard, P.K., Milligan, P., Bojang, K., Doherty, T., Plebanski, M., Akinwunmi, P., Everaere, S., Watkins, K.R., et al. (2004). A CD4(+) T-cell immune response to a conserved epitope in the circumsporozoite protein correlates with protection from natural *Plasmodium falciparum* infection and disease. *Nat. Med.* *10*, 406–410.

Rénia, L., Wu Howland, S., Claser, C., Charlotte Gruner, A., Suwanarusk, R., Hui Teo, T., Russell, B., and Ng, L. (2012). Cerebral malaria. *Virulence* *3*, 193–201.

Rifakis, P.M., Hernandez, O., Fernández, C.T., Rodriguez-Morales, A.J., Von, A., and Franco-Paredes, C. (2008). Atypical *Plasmodium vivax* malaria in a traveler: bilateral hydronephrosis, severe thrombocytopenia, and hypotension. *J Travel Med* *15*, 119–121.

- Rodrigues de Araújo, A., Iles, B., de Melo Nogueira, K., Dias, J. do N., Plácido, A., Rodrigues, A., Albuquerque, P., Silva-Pereira, I., Socodatto, R., Portugal, C.C., et al. (2019). Antifungal and anti-inflammatory potential of eschweilenol C-rich fraction derived from *Terminalia fagifolia* Mart. *Journal of Ethnopharmacology* 240, 111941.
- Rodriguez, A.A.M., Carvalho, L.J.M., Kimura, E.A., and Katzin, A.M. (2018). Perillyl alcohol exhibits in vitro inhibitory activity against *Plasmodium falciparum* and protects against experimental cerebral malaria. *International Journal of Antimicrobial Agents* 51, 370–377.
- Roestenberg, M., McCall, M., Hopman, J., Wiersma, J., Luty, A.J.F., van Gemert, G.J., van de Vegte-Bolmer, M., van Schaijk, B., Teelen, K., Arens, T., et al. (2009). Protection against a Malaria Challenge by Sporozoite Inoculation. *New England Journal of Medicine* 361, 468–477.
- Rolando, C. (1997). Etude anatomique du charbon chez les Combretum de l’Afrique de l’Ouest. *Bois et forêts des tropiques* 253, 47–56.
- Rowe, J.A., Claessens, A., Corrigan, R.A., and Arman, M. (2009). Adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Expert Rev Mol Med* 11.
- Safeukui, I., Millet, P., Boucher, S., Melinard, L., Fregeville, F., Receveur, M.-C., Pistone, T., Fialon, P., Vincendeau, P., Fleury, H., et al. (2008). Evaluation of FRET real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of *Plasmodium* species in returning travellers and migrants. *Malaria Journal* 7.
- Sanchez, C.P., Stein, W.D., and Lanzer, M. (2007). Is PfCRT a channel or a carrier? Two competing models explaining chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol.* 23, 332–339.
- Sandquist, I., and Kolls, J. (2018). Update on regulation and effector functions of Th17 cells. *F1000Res* 7.
- Sannella, A.R., Messori, L., Casini, A., Francesco Vincieri, F., Bilia, A.R., Majori, G., and Severini, C. (2007). Antimalarial properties of green tea. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353, 177–181.
- Sanni, L.A., Jarra, W., Li, C., and Langhorne, J. (2004). Cerebral edema and cerebral hemorrhages in interleukin-10-deficient mice infected with *Plasmodium chabaudi*. *Infect. Immun.* 72, 3054–3058.
- Sarkar, S., Keswani, T., Sengupta, A., Mitra, S., and Bhattacharyya, A. (2017). Differential modulation of glial cell mediated neuroinflammation in *Plasmodium berghei* ANKA infection by TGF β and IL 6. *Cytokine* 99, 249–259.
- Schmidt, K.E., Schumak, B., Specht, S., Dubben, B., Limmer, A., and Hoerauf, A. (2011). Induction of pro-inflammatory mediators in *Plasmodium berghei* infected BALB/c mice breaks blood-brain-barrier and leads to cerebral malaria in an IL-12 dependent manner. *Microbes Infect.* 13, 828–836.
- Seder, R.A., Chang, L.-J., Enama, M.E., Zephir, K.L., Sarwar, U.N., Gordon, I.J., Holman, L.A., James, E.R., Billingsley, P.F., Gunasekera, A., et al. (2013). Protection Against Malaria

by Intravenous Immunization with a Nonreplicating Sporozoite Vaccine. *Science* 341, 1359–1365.

Seguin, M.C., Klotz, F.W., Schneider, I., Weir, J.P., Goodbary, M., Slayter, M., Raney, J.J., Aniagolu, J.U., and Green, S.J. (1994). Induction of nitric oxide synthase protects against malaria in mice exposed to irradiated *Plasmodium berghei* infected mosquitoes: involvement of interferon gamma and CD8+ T cells. *J. Exp. Med.* 180, 353–358.

Shabani, E., Ouma, B.J., Idro, R., Bangirana, P., Opoka, R.O., Park, G.S., Conroy, A.L., and John, C.C. (2017). Elevated cerebrospinal fluid tumour necrosis factor is associated with acute and long-term neurocognitive impairment in cerebral malaria. *Parasite Immunol.* 39.

Shankar, A.H. (2000). Nutritional modulation of malaria morbidity and mortality. *J. Infect. Dis.* 182 Suppl 1, S37-53.

Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaeili, S.-A., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J.T., and Sahebkar, A. (2018). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of Cellular Physiology* 233, 6425–6440.

Shryock, N., McBerry, C., Salazar Gonzalez, R.M., Janes, S., Costa, F.T.M., and Aliberti, J. (2013). Lipoxin A₄ and 15-epi-lipoxin A₄ protect against experimental cerebral malaria by inhibiting IL-12/IFN- γ in the brain. *PLoS ONE* 8, e61882.

Shuaibu, M.N., Wuyep, P.A., Yanagi, T., Hirayama, K., Tanaka, T., and Kouno, I. (2008). The use of microfluorometric method for activity-guided isolation of antiplasmodial compound from plant extracts. *Parasitology Research* 102, 1119–1127.

Siddaiah et Ravindra (2015). Pharmacognostical evaluation of *Terminalia pallida* brandis. 9.

Sidhu, A.B.S., Uhlemann, A.-C., Valderramos, S.G., Valderramos, J.-C., Krishna, S., and Fidock, D.A. (2006). Decreasing pfmdr1 copy number in *Plasmodium falciparum* malaria heightens susceptibility to mefloquine, lumefantrine, halofantrine, quinine, and artemisinin. *J. Infect. Dis.* 194, 528–535.

Silva, H.B. da, Fonseca, R., Cassado, A. dos A., Salles, É.M. de, Menezes, M.N. de, Langhorne, J., Perez, K.R., Cuccovia, I.M., Ryffel, B., Barreto, V.M., et al. (2015). *In vivo* Approaches Reveal a Key Role for DCs in CD4+ T Cell Activation and Parasite Clearance during the Acute Phase of Experimental Blood-Stage Malaria. *PLOS Pathogens* 11, e1004598.

Smallegange, R.C., Qiu, Y.T., van Loon, J.J.A., and Takken, W. (2005). Synergism between ammonia, lactic acid and carboxylic acids as kairomones in the host-seeking behaviour of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* sensu stricto (Diptera: Culicidae). *Chem Senses* 30, 145–152.

Smith, T.G., Serghides, L., Patel, S.N., Febbraio, M., Silverstein, R.L., and Kain, K.C. (2003). CD36-Mediated Nonopsonic Phagocytosis of Erythrocytes Infected with Stage I and II A Gametocytes of *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun* 71, 393–400.

Soh, P.N., Witkowski, B., Olganier, D., Nicolau, M.-L., Garcia-Alvarez, M.-C., Berry, A., and Benoit-Vical, F. (2009). In vitro and in vivo properties of ellagic acid in malaria treatment. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 1100–1106.

- Sologub, L., Kuehn, A., Kern, S., Przyborski, J., Schillig, R., and Pradel, G. (2011). Malaria proteases mediate inside-out egress of gametocytes from red blood cells following parasite transmission to the mosquito: Inside-out egress of malaria gametocytes. *Cellular Microbiology* *13*, 897–912.
- de Sousa, J.O., de Albuquerque, B.C., Coura, J.R., and Suárez-Mutis, M.C. (2019). Use and retention of long-lasting insecticidal nets (LLINs) in a malaria risk area in the Brazilian Amazon: a 5-year follow-up intervention. *Malar J* *18*.
- de Souza, J.B., Hafalla, J.C.R., Riley, E.M., and Couper, K.N. (2010). Cerebral malaria: why experimental murine models are required to understand the pathogenesis of disease. *Parasitology* *137*, 755–772.
- Spaulding, E., Fooksman, D., Moore, J.M., Saidi, A., Feintuch, C.M., Reizis, B., Chorro, L., Daily, J., and Lauvau, G. (2016). STING-Licensed Macrophages Prime Type I IFN Production by Plasmacytoid Dendritic Cells in the Bone Marrow during Severe *Plasmodium yoelii* Malaria. *PLoS Pathog.* *12*, e1005975.
- Stephens, R., Culleton, R.L., and Lamb, T.J. (2012). The contribution of *Plasmodium chabaudi* to our understanding of malaria. *Trends Parasitol.* *28*, 73–82.
- Stevenson, M.M., and Riley, E.M. (2004). Innate immunity to malaria. *Nat Rev Immunol* *4*, 169–180.
- Stevenson, M.M., Tam, M.F., Wolf, S.F., and Sher, A. (1995). IL-12-induced protection against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS requires IFN-gamma and TNF-alpha and occurs via a nitric oxide-dependent mechanism. *J. Immunol.* *155*, 2545–2556.
- Storm, J., and Craig, A.G. (2014). Pathogenesis of cerebral malaria--inflammation and cytoadherence. *Front Cell Infect Microbiol* *4*, 100.
- Storm, J., Jespersen, J.S., Seydel, K.B., Szeszak, T., Mbewe, M., Chisala, N.V., Phula, P., Wang, C.W., Taylor, T.E., Moxon, C.A., et al. (2019). Cerebral malaria is associated with differential cytoadherence to brain endothelial cells. *EMBO Molecular Medicine* *11*.
- Su, Z., and Stevenson, M.M. (2000). Central role of endogenous gamma interferon in protective immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection. *Infect. Immun.* *68*, 4399–4406.
- Sun, Y., Guilavogui, T., Camara, A., Dioubaté, M., Toure, B.D., Bahati, C., Fargier, M.P., Butts, J., Condo, P., Sarr, A., et al. (2018). Evaluating the quality of routinely reported data on malaria commodity stocks in Guinea, 2014–2016. *Malar J* *17*.
- Sutherland, C.J., Tanomsing, N., Nolder, D., Oguike, M., Jennison, C., Pukrittayakamee, S., Dolecek, C., Hien, T.T., do Rosário, V.E., Arez, A.P., et al. (2010). Two Nonrecombining Sympatric Forms of the Human Malaria Parasite *Plasmodium ovale* Occur Globally. *The Journal of Infectious Diseases* *201*, 1544–1550.
- Tanaka, M., Kishimoto, Y., Sasaki, M., Sato, A., Kamiya, T., Kondo, K., and Iida, K. (2018). Terminalia bellirica (Gaertn.) Roxb. Extract and Gallic Acid Attenuate LPS-Induced Inflammation and Oxidative Stress via MAPK/NF-κB and Akt/AMPK/Nrf2 Pathways. *Oxid Med Cell Longev* *2018*, 9364364.

Références

- Taniguchi, T., Md Mannoor, K., Nonaka, D., Toma, H., Li, C., Narita, M., Vanisaveth, V., Kano, S., Takahashi, M., and Watanabe, H. (2017). A Unique Subset of $\gamma\delta$ T Cells Expands and Produces IL-10 in Patients with Naturally Acquired Immunity against *falciparum* Malaria. *Front Microbiol* 8.
- Tasdemir, D., Lack, G., Brun, R., Rüedi, P., Scapozza, L., and Perozzo, R. (2006). Inhibition of *Plasmodium falciparum* fatty acid biosynthesis: evaluation of FabG, FabZ, and FabI as drug targets for flavonoids. *J. Med. Chem.* 49, 3345–3353.
- Tchinda, A.T., Ngonu, A.R.N., Tamze, V., Jonville, M.-C., Cao, M., Angenot, L., and Frédérick, M. (2012). Antiplasmodial alkaloids from the stem bark of *Strychnos malacoclados*. *Planta Med.* 78, 377–382.
- Tebo, A.E., Kremsner, P.G., and Luty, A.J.F. (2002). Fc γ receptor-mediated phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes in vitro. *Clin Exp Immunol* 130, 300–306.
- Teo, A., Feng, G., Brown, G.V., Beeson, J.G., and Rogerson, S.J. (2016). Functional Antibodies and Protection against Blood-stage Malaria. *Trends Parasitol.* 32, 887–898.
- Thylur, R.P., Wu, X., Gowda, N.M., Punnath, K., Neelgund, S.E., Febbraio, M., and Gowda, D.C. (2017). CD36 receptor regulates malaria-induced immune responses primarily at early blood stage infection contributing to parasitemia control and resistance to mortality. *J. Biol. Chem.* 292, 9394–9408.
- Tian, Y.-Q., Hu, G.-W., and Guo, M.-Q. (2016). Components and Anti-HepG2 Activity Comparison of Lycopodium Alkaloids from Four Geographic Origins.
- Tinto, H., Guekoun, L., Zongo, I., Guiguemdé, R.T., D'Alessandro, U., and Ouédraogo, J.B. (2008). Chloroquine-resistance molecular markers (Pfcrt T76 and Pfmdr-1 Y86) and amodiaquine resistance in Burkina Faso. *Trop. Med. Int. Health* 13, 238–240.
- Torre, D. (2009). Early Production of γ -Interferon in Clinical Malaria: Role of Interleukin-18 and Interleukin-12. *Clin Infect Dis* 48, 1481–1482.
- Torre, D., Speranza, F., Giola, M., Matteelli, A., Tambini, R., and Biondi, G. (2002). Role of Th1 and Th2 cytokines in immune response to uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9, 348–351.
- Traore, M.S., Baldé, M.A., Diallo, M.S.T., Baldé, E.S., Diané, S., Camara, A., Diallo, A., Balde, A., Keita, A., Keita, S.M., et al. (2013). Ethnobotanical survey on medicinal plants used by Guinean traditional healers in the treatment of malaria. *J Ethnopharmacol* 150, 1145–1153.
- Traore, M.S., Diane, S., Diallo, M.S.T., Balde, E.S., Balde, M.A., Camara, A., Diallo, A., Keita, A., Cos, P., Maes, L., et al. (2014). In vitro antiprotozoal and cytotoxic activity of ethnopharmacologically selected guinean plants. *Planta Med.* 80, 1340–1344.
- Traore-Coulibaly, M., Pare-Toe, L., Sorgho, H., Koog, C., Kazienga, A., Dabire, K.R., Gouagna, L.C., Dakuyo, P.Z., Ouedraogo, J.B., Guissou, I.P., et al. (2013). Antiplasmodial and repellent activity of indigenous plants used against malaria. *JMPR* 7, 3105–3111.

Références

- Tripathi, A.K., Sha, W., Shulaev, V., Stins, M.F., and Sullivan, D.J. (2009). *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes induce NF-kappaB regulated inflammatory pathways in human cerebral endothelium. *Blood* *114*, 4243–4252.
- Tripathy, S., and Roy, S. (2015). Redox sensing and signaling by malaria parasite in vertebrate host. *J. Basic Microbiol.* *55*, 1053–1063.
- Troye-Blomberg, M., Riley, E.M., Kabilan, L., Holmberg, M., Perlmann, H., Andersson, U., Heusser, C.H., and Perlmann, P. (1990). Production by activated human T cells of interleukin 4 but not interferon-gamma is associated with elevated levels of serum antibodies to activating malaria antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* *87*, 5484–5488.
- Tse, E.G., Korsik, M., and Todd, M.H. (2019). The past, present and future of anti-malarial medicines. *Malar. J.* *18*, 93.
- Tuenter, E., Exarchou, V., Baldé, A., Cos, P., Maes, L., Apers, S., and Pieters, L. (2016). Cyclopeptide Alkaloids from *Hymenocardia acida*. *J. Nat. Prod.* *79*, 1746–1751.
- Ty, M.C., Zuniga, M., Götz, A., Kayal, S., Sahu, P.K., Mohanty, A., Mohanty, S., Wassmer, S.C., and Rodriguez, A. (2019). Malaria inflammation by xanthine oxidase-produced reactive oxygen species. *EMBO Molecular Medicine* *11*, e9903.
- Unno, K., Pervin, M., Nakagawa, A., Iguchi, K., Hara, A., Takagaki, A., Nanjo, F., Minami, A., and Nakamura, Y. (2017). Blood-Brain Barrier Permeability of Green Tea Catechin Metabolites and their Neurotogenic Activity in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. *Mol Nutr Food Res* *61*.
- USAID 2018 Guinea Malaria Operational Plan FY 2018. 78.
- Van Vliet, 1979, G.J.C.M. Wood anatomy of the Combretaceae.
- Vaughan, A.M., Aly, A.S.I., and Kappe, S.H.I. (2008). Malaria Parasite Pre-Erythrocytic Stage Infection: Gliding and Hiding. *Cell Host & Microbe* *4*, 209–218.
- Veglia, F., and Gabrilovich, D.I. (2017). Dendritic cells in cancer: the role revisited. *Curr Opin Immunol* *45*, 43–51.
- Vennerstrom, J.L., Nuzum, E.O., Miller, R.E., Dorn, A., Gerena, L., Dande, P.A., Ellis, W.Y., Ridley, R.G., and Milhous, W.K. (1999). 8-Aminoquinolines Active against Blood Stage *Plasmodium falciparum* In Vitro Inhibit Hematin Polymerization. *Antimicrob Agents Chemother* *43*, 598–602.
- VERHOEVEN, R., RL, V., and HP, V.D.S. (1973). A key to the south african combretaceae based on anatomical characteristics of leaf. A key to the south african combretaceae based on anatomical characteristics of leaf.
- Villegas-Mendez, A., Greig, R., Shaw, T.N., de Souza, J.B., Findlay, E.G., Stumhofer, J.S., Hafalla, J.C.R., Blount, D.G., Hunter, C.A., Riley, E.M., et al. (2012). IFN- γ producing CD4⁺ T cells promote experimental cerebral malaria by modulating CD8⁺ T cell accumulation within the brain. *J Immunol* *189*, 968–979.

- Villegas-Mendez, A., Strangward, P., Shaw, T.N., Rajkovic, I., Tosevski, V., Forman, R., Muller, W., and Couper, K.N. (2017). Gamma Interferon Mediates Experimental Cerebral Malaria by Signaling within Both the Hematopoietic and Nonhematopoietic Compartments. *Infection and Immunity* 85, e01035-16.
- Vlachou, D., Schlegelmilch, T., Runn, E., Mendes, A., and Kafatos, F.C. (2006). The developmental migration of *Plasmodium* in mosquitoes. *Current Opinion in Genetics & Development* 16, 384–391.
- Walker, J.A., and McKenzie, A.N.J. (2018). TH2 cell development and function. *Nat. Rev. Immunol.* 18, 121–133.
- Walsh, K.P., and Mills, K.H.G. (2013). Dendritic cells and other innate determinants of T helper cell polarisation. *Trends Immunol.* 34, 521–530.
- Walshe, D.P., Garner, P., Abdel-Hameed Adeel, A.A., Pyke, G.H., and Burkot, T. (2013). Larvivorous fish for preventing malaria transmission. *Cochrane Database Syst Rev* 1–65.
- Wang, G.-Q., He, X.-M., Zhu, G.-F., Li, D.-D., Shi, J.-S., and Zhang, F. (2019). Ellagic acid supports neuron by regulating astroglia Nrf2. *Biotechnol. Appl. Biochem.*
- Wang, H., Sun, Z., Liu, D., Li, X., Rehman, R., Wang, H., and Wu, Z. (2018). Apple phlorizin attenuates oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Food Biochemistry* e12744.
- Wassmer, S.C., Taylor, T.E., Rathod, P.K., Mishra, S.K., Mohanty, S., Arevalo-Herrera, M., Duraisingh, M.T., and Smith, J.D. (2015). Investigating the Pathogenesis of Severe Malaria: A Multidisciplinary and Cross-Geographical Approach. *Am J Trop Med Hyg* 93, 42–56.
- von der Weid, T., Kopf, M., Köhler, G., and Langhorne, J. (1994). The immune response to *Plasmodium chabaudi* malaria in interleukin-4-deficient mice. *Eur. J. Immunol.* 24, 2285–2293.
- White, N.J. (2018). Anaemia and malaria. *Malaria Journal* 17.
- White, N.J., Pukrittayakamee, S., Hien, T.T., Faiz, M.A., Mokuolu, O.A., and Dondorp, A.M. (2014). Malaria. *The Lancet* 383, 723–735.
- WHO, 1978 The promotion and development of traditional medicine : report of a WHO meeting [held in Geneva from 28 November to 2 December 1977]. Consulté le 29/09/2019.
- WHO, 2003 The Abuja declaration and the plan of action. Extract of African Summit on Roll Back Malaria. 25 April (2000), Abuja, Nigeria. Reference number: WHO/CDS/RBM/2003.46. Consulté le 29/09/2019.
- WHO, 2013 OMS | La prise en charge du paludisme grave – guide pratique. Troisième édition.
- Wilke, A.B.B., and Marrelli, M.T. (2015). Paratransgenesis: a promising new strategy for mosquito vector control. *Parasites & Vectors* 8, 342.
- Willcox, M. (2011). Improved traditional phytomedicines in current use for the clinical treatment of malaria. *Planta Med.* 77, 662–671.

Références

- Willcox, M., Sanogo, R., Diakite, C., Giani, S., Paulsen, B.S., and Diallo, D. (2012). Improved Traditional Medicines in Mali. *J Altern Complement Med* 18, 212–220.
- Wipasa, J., Suphavitai, C., Okell, L.C., Cook, J., Corran, P.H., Thaikla, K., Liwsaree, W., Riley, E.M., and Hafalla, J.C.R. (2010). Long-Lived Antibody and B Cell Memory Responses to the Human Malaria Parasites, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *PLoS Pathog* 6.
- Wongsrichanalai, C., and Meshnick, S.R. (2008). Declining artesunate-mefloquine efficacy against falciparum malaria on the Cambodia-Thailand border. *Emerging Infect. Dis.* 14, 716–719.
- World Health Organization, and Global Malaria Programme (2015). Guidelines for the treatment of malaria.
- Wu, H., Pang, H., Chen, Y., Huang, L., Liu, H., Zheng, Y., Sun, C., Zhang, G., and Wang, G. (2018). Anti-Inflammatory Effect of a Polyphenol-Enriched Fraction from *Acalypha wilkesiana* on Lipopolysaccharide-Stimulated RAW 264.7 Macrophages and Acetaminophen-Induced Liver Injury in Mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2018, 1–17.
- Wu, X., Gowda, N.M., Kumar, S., and Gowda, D.C. (2010). Protein-DNA complex is the exclusive malaria parasite component that activates dendritic cells and triggers innate immune responses. *J Immunol* 184, 4338–4348.
- Wykes, M.N., and Lewin, S.R. (2018). Immune checkpoint blockade in infectious diseases. *Nat Rev Immunol* 18, 91–104.
- Wykes, M.N., Liu, X.Q., Jiang, S., Hirunpetcharat, C., and Good, M.F. (2007). Systemic tumor necrosis factor generated during lethal *Plasmodium* infections impairs dendritic cell function. *J. Immunol.* 179, 3982–3987.
- Yaidikar, L., and Thakur, S. (2015). Arjunolic acid, a pentacyclic triterpenoidal saponin of *Terminalia arjuna* bark protects neurons from oxidative stress associated damage in focal cerebral ischemia and reperfusion. *Pharmacological Reports* 67, 890–895.
- Yam, X.Y., Niang, M., Madnani, K.G., and Preiser, P.R. (2017). Three Is a Crowd - New Insights into Rosetting in *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol.* 33, 309–320.
- Yang, M.H., Ali, Z., Khan, I.A., and Khan, S.I. (2014). Anti-inflammatory Activity of Constituents Isolated from *Terminalia chebula*. *Natural Product Communications* 9, 1934578X1400900.
- Zander, R.A., Obeng-Adjei, N., Guthmiller, J.J., Kulu, D.I., Li, J., Ongoiba, A., Traore, B., Crompton, P.D., and Butler, N.S. (2015). PD-1 co-inhibitory and OX40 co-stimulatory crosstalk regulates helper T cell differentiation and anti-*Plasmodium* humoral immunity. *Cell Host Microbe* 17, 628–641.
- Zaw, M.T., and Lin, Z. (2017). Two sympatric types of *Plasmodium ovale* and discrimination by molecular methods. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 50, 559–564.

ANNEXE

Tableau 9 : Activité antiprotozoaire et cytotoxique *in vitro* de 41 extraits de plantes sélectionnés (Traore et al., 2014).

Plant name	Plant part (solvent)	Antiprotozoal activity (IC ₅₀ , µg/mL)				Cytotoxicity (CC ₅₀ , µg/mL)	Selectivity index			
		Tbb	T.cruzi	L.Inf	Pf-K1		MR-C5	MRC-5 / Tbb	MRC-5 / T.cruzi	MRC-5 / L.inf
<i>Albizia zygia</i>	Sb (EtOH 70 %)	22.37	>64.00	22.37	18.1	>64.00	>2.86	Nd	>2.86	>3.54
<i>Alchornea cordifolia</i>	Sb (MeOH)	8.5	11.31	32.46	9.54	>64.00	>7.53	>5.66	>1.97	>6.71
<i>Alchornea cordifolia</i>	Sb (H ₂ O)	>64.00	>64.00	>64.00	11.02	>64.00	Nd	Nd	Nd	>5.81
<i>Alchornea cordifolia</i>	L (MeOH)	8.57	9.56	32.46	9.33	>64.00	>7.47	>6.69	>1.97	>6.86
<i>Alchornea cordifolia</i>	Sb (Hexane)	32.22	27.86	>64.00	>64.00	>64.00	>1.99	>2.30	Nd	Nd
<i>Alchornea cordifolia</i>	L (Hexane)	8.3	25.81	38.05	25.94	>64.00	>7.71	>2.48	>1.68	>2.47
<i>Azadirachta indica</i>	L (MeOH)	8.17	20.71	>64.00	18.38	34.27	4.19	1.65	<0.54	1.86
<i>Azadirachta indica</i>	L (H ₂ O)	>64.00	>64.00	>64.00	>64.00	>64.00	Nd	Nd	Nd	Nd
<i>Azadirachta indica</i>	L (CHCl ₃)	20.16	40.02	32.46	>64.00	>64.00	>3.17	>1.60	>1.97	Nd
<i>Bridelia ferruginea</i>	L (EtOH 70 %)	23.63	1.72	20.72	>64.00	12.9	0.55	7.50	0.62	<0.20
<i>Carica papaya</i>	L (MeOH)	8.17	8.16	32.46	11.41	32.22	3.94	3.95	0.99	2.82
<i>Carica papaya</i>	Rb (MeOH)	30.14	33.85	32.46	43.29	>64.00	>2.12	>1.89	>1.97	>1.48
<i>Cassia sieberiana</i>	Sb (EtOH 70 %)	19.45	11.38	>64	46.06	38.05	1.96	3.34	<0.59	0.83
<i>Cleistopholis patens</i>	Sb (EtOH 70 %)	11.38	22.78	20.72	29.11	23.33	2.05	1.02	1.13	0.80
<i>Cochlospermum tinctorium</i>	Rb (CHCl ₃)	Nt	Nt	Nt	17.07	>64.00	-	-	-	>3.74
<i>Combretum glutinosum</i>	L (MeOH)	26.51	23.68	>64.00	21.78	>64.00	>2.41	>2.70	Nd	>2.94
<i>Combretum glutinosum</i>	L (CHCl ₃)	2.91	2.18	20.72	20.24	20.48	7.04	9.39	0.99	1.01
<i>Diospyros mespiliformis</i>	L (EtOH 70 %)	25.2	25.77	>64.00	24.91	>64.00	>2.54	>2.48	Nd	>2.57
<i>Erythrina senegalensis</i>	L (EtOH 70 %)	20.97	20.54	>64.00	29.71	>64.00	>3.05	>3.11	Nd	>2.15

Annexe

<i>Ficus</i> sp	Sb (Hexane)	8.06	25.94	32.46	46.62	35.2	4.37	1.36	1.08	0.76
<i>Ficus</i> sp	Sb (MeOH)	39.83	>64.00	32.46	>64.00	>64.00	>1.61	Nd	>1.97	Nd
<i>Ficus vallis-choudae</i>	Sb (EtOH 70 %)	23.68	19.25	20.72	16.33	23.21	0.98	1.21	1.12	1.42
<i>Grewia villosa</i>	L (EtOH 70 %)	24.04	21.85	>64.00	33.98	>64.00	>2.66	>2.93	Nd	>1.88
<i>Guiera senegalensis</i>	L (EtOH 70 %)	2.15	1.99	20.72	23.00	21.23	9.87	10.67	1.02	0.92
<i>Hymenocardia acida</i>	L (Hexane)	8.06	8.19	32.46	33.07	32.22	4.00	3.93	0.99	0.97
<i>Hymenocardia acida</i>	Sb (MeOH)	8.56	>64.00	32.46	>64.00	55.17	6.45	<0.86	1.70	<0.86
<i>Hymenocardia acida</i>	Sb (H ₂ O)	37.26	>64.00	>64.00	11.02	55.17	1.48	<0.86	<0.86	5.01
<i>Hymenocardia acida</i>	Sb (Hexane)	32.22	35.51	>64.00	>64.00	>64.00	>1.99	>1.80	Nd	Nd
<i>Hymenocardia acida</i>	L (MeOH)	>64.00	>64.00	>64.00	>64.00	>64.00	Nd	Nd	Nd	Nd
<i>Lantana camara</i>	L (MeOH)	8.17	7.87	32.46	24.35	18.19	2.23	2.31	0.56	0.75
<i>Lawsonia inermis</i>	L (MeOH)	8.3	31.1	32.46	23.38	41.9	5.05	1.35	1.29	1.79
<i>Margaritaria discoidea</i>	L (MeOH)	32.94	37.15	>64.00	>64.00	>64.00	>1.94	>1.72	Nd	Nd
<i>Margaritaria discoidea</i>	L (CHCl ₃)	2.01	32.75	>64.00	>64.00	>64.00	>31.84	>1.95	Nd	Nd
<i>Markhamia tomentosa</i>	L (EtOH 70 %)	24.04	26.1	>64.00	27.48	>64.00	>2.66	>2.45	Nd	>2.33
<i>Mezoneuron benthamianum</i>	L (MeOH)	30.14	35.33	32.46	5.84	>64.00	>2.12	>1.81	>1.97	>10.96
<i>Morinda geminata</i>	Rb (EtOH 70 %)	20.97	25.79	>64.00	17.91	22.39	1.07	0.87	<0.35	1.25
<i>Newbouldia laevis</i>	Rb (MeOH)	>64.00	8.36	32.46	9.15	15.3	<0.24	1.83	0.47	1.67
<i>Paullinia pinnata</i>	L (EtOH 70 %)	22.37	14.47	>64.00	17.27	>64.00	>2.86	>4.42	Nd	>3.71
<i>Pavetta</i> sp	Sb (alkaloids. CHCl ₃)	1.84	33.55	20.32	34.27	>64.00	>34.78	>1.91	>3.15	>1.87
<i>Pavetta crassipes</i>	L (CHCl ₃)	1.97	2.16	20.32	31.42	8.93	4.53	4.13	0.43	0.28
<i>Pavetta crassipes</i>	L (alkaloids. CHCl ₃)	33.99	20.36	>64.00	4.92	>64.00	>1.88	>3.14	Nd	>13.0
<i>Phyllanthus niruri</i>	Wp (CHCl ₃)	1.84	33.51	32.46	>64.00	>64.00	>34.78	>1.91	>1.97	Nd

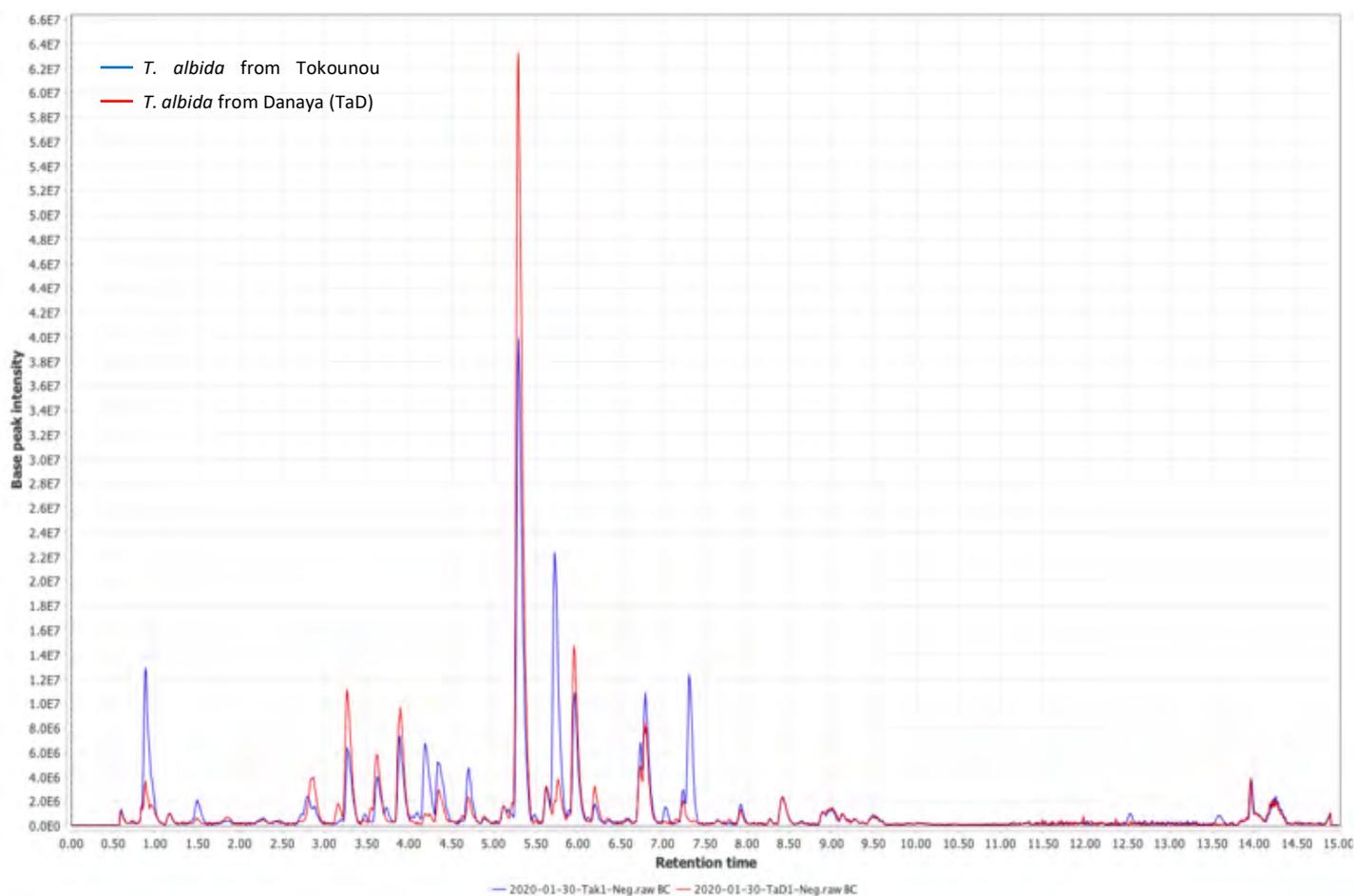
Annexe

<i>Phyllanthus niruri</i>	Wp (MeOH)	2.09	59.17	50.80	>64.00	>64.00	>30.62	>1.08	>1.26	Nd
<i>Phyllanthus amarus</i>	Wp (CHCl ₃)	7.16	37.55	32.46	48.25	>64.00	>8.94	>1.70	>1.97	>1.33
<i>Phyllanthus amarus</i>	Wp (MeOH)	13.50	40.62	32.46	42.33	>64.00	>4.74	>1.57	>1.97	>1.51
<i>Piliostigma thonningii</i>	L (EtOH 70 %)	29.91	>64.00	>64.00	33.63	>64.00	>2.07	Nd	Nd	>1.90
<i>Rhaphiostylis beninensis</i>	L (MeOH)	>64.00	46.48	32.46	>64.00	>64.00	Nd	>1.38	>1.97	Nd
<i>Pseudospondias microcarpa</i>	Sb (MeOH)	>64.00	34.27	>64.00	>64.00	>64.00	Nd	>1.87	Nd	Nd
<i>Spondias mombin</i>	L (Hexane)	10.92	22.17	32.22	24.18	24.25	2.22	1.09	0.75	1.00
<i>Spondias mombin</i>	Sb (Hexane)	12.23	29.51	>64	>64.00	>64.00	>5.23	>2.17	Nd	Nd
<i>Spondias mombin</i>	L (MeOH)	22.03	31.15	>64	2.78	>64.00	>2.91	>2.05	Nd	>23.02
<i>Spondias mombin</i>	Sb (MeOH)	8.5	33.24	>64	34.78	>64.00	>7.53	>1.93	Nd	>1.84
<i>Spondias mombin</i>	Sb (H ₂ O)	2.35	35.79	>64	59.50	>64.00	>27.23	>1.79	Nd	>1.08
<i>Strophanthus hispidus</i>	Rb (MeOH)	>64.00	>64.00	>64.00	>64.00	>64.00	Nd	Nd	Nd	Nd
<i>Terminalia albida</i>	L (EtOH 70 %)	20.97	20.54	20.72	29.71	>64.00	>3.05	>3.12	>3.09	>2.15
<i>Terminalia albida</i>	Sb (MeOH)	35.49	>64	32.46	0.64	>64.00	>1.80	Nd	>1.97	>100.00
<i>Terminalia macroptera</i>	Rb (EtOH 70 %)	2.75	20.24	20.72	6.85	>64.00	>23.29	>3.16	>3.09	>9.35
<i>Tetracera alnifolia</i>	L (CHCl ₃)	20.16	40.02	32.46	>64.00	>64.00	>3.17	>1.60	>1.97	Nd
<i>Tetracera alnifolia</i>	L (MeOH)	28.15	>64.00	8.15	>64.00	>64.00	>2.27	Nd	>7.85	Nd
<i>Tetracera alnifolia</i>	L (H ₂ O)	>64.00	>64.00	>64.00	>64.00	>64.00	Nd	Nd	Nd	Nd
<i>Trichilia emetica</i>	Sb (EtOH 70 %)	24.80	22.78	>64.00	15.53	>64.00	>2.58	>2.81	Nd	>4.12
<i>Uapaca togoensis</i>	Sb (MeOH)	35.52	>64.00	32.46	>64.00	>64.00	>1.80	Nd	>1.97	Nd
<i>Uapaca togoensis</i>	Sb (CHCl ₃)	>64.00	>64.00	>64.00	>64.00	>64.00	Nd	Nd	Nd	Nd
<i>Vismia guineensis</i>	L (CHCl ₃)	20.72	25.08	20.72	20.70	50.01	2.41	1.99	2.41	2.42
<i>Vismia guineensis</i>	L (MeOH)	2.05	6.80	20.72	9.16	14.24	6.94	2.09	0.68	1.55
<i>Vismia guineensis</i>	L (H ₂ O)	26.06	>64.00	>64.00	46.06	35.51	1.36	<0.55	<0.55	0.77

Annexe

<i>Vismia guineensis</i>	Sb (CHCl ₃)	15.23	2.27	20.72	1.90	11.88	0.78	5.23	0.57	6.25
<i>Vismia guineensis</i>	Sb (MeOH)	6.75	2.14	20.72	3.03	8.58	1.27	4.00	0.41	2.83
<i>Vismia guineensis</i>	Sb (H ₂ O)	28	23.55	20.72	56.18	>64.00	>2.28	>2.71	>3.08	>1.13
<i>Vismia guineensis</i>	Rb (CHCl ₃)	2.15	2.05	20.72	1.94	5.16	2.4	2.51	0.24	2.65
<i>Vismia guineensis</i>	Rb (MeOH)	2.40	2.30	20.72	1.82	16.39	6.82	7.12	0.79	9.00
<i>Vismia guineensis</i>	Rb (H ₂ O)	26.51	23.08	20.72	>64	31.67	1.19	1.37	1.52	<0.49
<i>Ximenia americana</i>	Sb (MeOH)	37.26	32.26	32.46	>64	>64	>1.72	>1.98	>1.97	Nd
<i>Zanthoxylum zanthoxyloides</i>	Rb (MeOH)	38.05	22.23	>64.00	>64.00	>64.00	1.68	2.88	Nd	Nd
Chloroquine					0.047 µM					
Suramin		0.035 µM								
Benznidazol			2.0 µM							
Miltefosine				6.1 µM						
Tamoxifen						11.0 µM				

Figure 43 : UHPLC-HRMS en mode ESI déréplication par MS-Finder : chromatogramme en mode négatif.



RESEARCH

Open Access



Terminalia albida treatment improves survival in experimental cerebral malaria through reactive oxygen species scavenging and anti-inflammatory properties

Aissata Camara^{1,2*} , Mohamed Haddad¹, Karine Reybier¹, Mohamed Sahar Traoré^{2,3}, Mamadou Aliou Baldé^{2,3}, Jade Royo¹, Alpha Omar Baldé^{2,3}, Philippe Batigne¹, Mahamane Haidara⁴, Elhadj Saidou Baldé^{2,3}, Agnès Coste¹, Aliou Mamadou Baldé³ and Agnès Aubouy¹

Abstract

Background: The development of *Plasmodium* resistance to the last effective anti-malarial drugs necessitates the urgent development of new anti-malarial therapeutic strategies. To this end, plants are an important source of new molecules. The objective of this study was to evaluate the anti-malarial effects of *Terminalia albida*, a plant used in Guinean traditional medicine, as well as its anti-inflammatory and antioxidant properties, which may be useful in treating cases of severe malaria.

Methods: In vitro antiplasmodial activity was evaluated on a chloroquine-resistant strain of *Plasmodium falciparum* (K-1). In vivo efficacy of the plant extract was measured in the experimental cerebral malaria model based on *Plasmodium berghei* (strain ANKA) infection. Mice brains were harvested on Day 7–8 post-infection, and T cells recruitment to the brain, expression levels of pro- and anti-inflammatory markers were measured by flow cytometry, RT-qPCR and ELISA. Non-malarial in vitro models of inflammation and oxidative response were used to confirm *Terminalia albida* effects. Constituents of *Terminalia albida* extract were characterized by ultra-high performance liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry. Top ranked compounds were putatively identified using plant databases and in silico fragmentation patterns.

Results: In vitro antiplasmodial activity of *Terminalia albida* was confirmed with an IC₅₀ of 1.5 µg/mL. In vivo, *Terminalia albida* treatment greatly increased survival rates in *P. berghei*-infected mice. Treated mice were all alive until Day 12, and the survival rate was 50% on Day 20. *Terminalia albida* treatment also significantly decreased parasitaemia by 100% on Day 4 and 89% on Day 7 post-infection. In vivo anti-malarial activity was related to anti-inflammatory properties, as *Terminalia albida* treatment decreased T lymphocyte recruitment and expression of pro-inflammatory markers in brains of treated mice. These properties were confirmed in vitro in the non-malarial model. In vitro, *Terminalia albida* also demonstrated a remarkable dose-dependent neutralization activity of reactive oxygen species. Twelve compounds were putatively identified in *Terminalia albida* stem bark. Among them, several molecules already identified may be responsible for the different biological activities observed, especially tannins and triterpenoids.

*Correspondence: aichali2004@yahoo.fr

¹ UMR152 PHARMADEV, IRD, UPS, Université de Toulouse, Toulouse, France

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2019. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Conclusion: The traditional use of *Terminalia albida* in the treatment of malaria was validated through the combination of in vitro and in vivo studies.

Keywords: *Terminalia albida*, Malaria, Experimental cerebral malaria, Inflammatory response, Oxidative stress, UHPLC-HRMS

Background

Malaria continues to be one of the primary medical concerns in many countries worldwide in terms of number of cases and deaths. In 2017, there were approximately 219 million malaria cases and 435,000 deaths worldwide, 91% of these in sub-Saharan Africa [1]. Today, there are few efficient anti-malarial treatments, and all are derived from artemisinin. However, *Plasmodium falciparum* has developed mechanisms of resistance to artemisinin and its derivatives, particularly in Southeast Asia [2]. Recent studies report increasing time for parasite clearance after treatment in a few parasite isolates originating from West Africa [3, 4]. The development of new treatments based on effective molecules using mechanisms of action, which are different to artemisinin and its derivatives, is thus urgently needed.

Malaria occurs in different forms; it can be uncomplicated, or it may lead to more severe pathologies, particularly cerebral malaria (CM). This is the deadliest form of malaria, with a mortality rate of approximately 15–25% [5]. The cerebral complications are related to a preferential localization of infected erythrocytes (iEs) in the brain through interactions between parasite proteins expressed on the surface of infected red blood cells and brain endothelium [6]. The mechanical obstruction of brain blood flow due to accumulation of iEs and rosetting leads to ischemia, hypoxia and activation of cerebral endothelium [7]. Activated endothelium produces pro-inflammatory cytokines and chemokines involved in the recruitment of immune cells. While the role of monocytes, macrophages and dendritic cells is to remove iEs by phagocytosis, they also produce pro-inflammatory cytokines that activate cytotoxic T cells involved in blood–brain barrier damage [8]. Degradation of haemoglobin by the parasite generates large quantities of toxic free haem and reactive oxygen species (ROS), causing cell damage to the host [9]. In addition, ROS production by monocytes/macrophages is an efficient host defence mechanism, although these oxidative processes lead to an imbalance between pro- and anti-oxidant responses, resulting in oxidative stress [10].

Plants are a significant source of molecules for the development of new drugs. Many plants from traditional medicine have provided opportunities for the identification of anti-malarial molecules. *Artemisia annua* (Asteraceae), a plant used in traditional Chinese medicine, is

currently the basis of the last effective treatment strategy [11]. However, specific research of active natural products against severe malaria is scarce. Among the biologically active plant species, *Terminalia albida*, a member of the Combretaceae family traditionally used in Guinea to treat malaria, has shown promising anti-malarial effects against *P. falciparum* (clone Pf-K1, IC₅₀ = 0.6 µg/mL) [12]. It was previously demonstrated that treatment with *Terminalia macroptera*, another species of the same genus, facilitated increased survival in experimental cerebral malaria (ECM) [13]. Therefore, this study was designed to assess the potential anti-malarial and anti-plasmodial effects of *Terminalia albida* in the murine model of ECM. Anti-inflammatory and anti-oxidant mechanisms of *Terminalia albida* treatment, which may resolve neuro-inflammation, were also investigated both in vitro and in the murine model of ECM. The phytochemical content of the crude extract was then explored by a dereplication approach in order to understand the origin of the bioactivity.

Methods

Plant collection

The stem bark of *Terminalia albida* was collected in Danaya, Préfecture of Dubréka, Guinea. The plant was collected at maturity in a forest area. Authorization for collection of plant materials was obtained prior to collection at the Institut de Recherche et de Développement des Plantes Médicinales et Alimentaires de Guinée (IRDPMAG), Dubréka, Guinea. The identification and authentication was previously carried out by the Department of Botany of IRDPMAG where a voucher specimen (38HK457) was deposited [14].

Preparation of *Terminalia albida* extract

The stem barks of the plant were shade dried for 2 weeks and ground into powder. The powdered material (600 g) was macerated with 2 L of pure methanol (>99%) for 72 h. The macerate was then filtered and evaporated under reduced pressure (Buchi® rotary evaporator, model R-200). The dried extracts were stored at –20 °C until use. Before in vitro and in vivo experiments, stock solutions were dissolved in distilled water to provide working concentrations.

In vitro antiplasmodial activity

The in vitro antiplasmodial activity of *Terminalia albida* was investigated using the SYBR Green I-based fluorescence assay with *P. falciparum* chloroquine-resistant sensitive strain K1, as described before [15]. Chloroquine was used as the positive control. Briefly, K1 cultures were maintained at 2% haematocrit in RPMI 1640 containing 10% human serum, 3 g/L of glucose, 45 µg/L of hypoxanthine, and 50 µg/L of gentamicin, and incubated at 37 °C under a gas mixture of 5% O₂, 5% CO₂, and 90% N₂. A suspension of sorbitol-synchronized, infected red blood cells was adjusted to 0.5% parasitaemia and 4% haematocrit in complete medium and added to the wells in a 96-well plate. Several wells containing non-parasitized erythrocytes at 4% haematocrit served as reference controls. Stock solutions (at 10 mM in ethanol for plant extracts and in water for chloroquine) were diluted serially in complete medium to test final concentrations ranging from 0 to 10⁻⁵ M in triplicates in the 96-well plate. Test plates were incubated at 37 °C for 48 h and 100 µL of SYBR Green I in lysis buffer was added to the wells. After 1 h of incubation in the dark at room temperature, fluorescence data were acquired on a Cytofluor II fluorescence multiwell plate reader (PerSeptive Biosystems, Framingham, USA) with excitation and emission wavelength bands at 485 and 530 nm, respectively, and a gain setting equal to 50. After subtraction of background values, the counts were plotted against the logarithm of the drug concentration and curve fitting by nonlinear regression (sigmoidal dose–response/variable slope equation) to yield the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) that served as a measure of the anti-malarial activity.

Animal studies

Female healthy C57BL/6 mice aged 12 weeks and weighing 20–22 g were obtained from Janvier Laboratories (Toulouse, France). For all in vivo experiments described below, the mice were kept in standard and constant laboratory conditions (23–25 °C, relative humidity around 60%, and light/dark cycles, i.e., 12/12 h) with unlimited access to food and tap water. Animal welfare requirements were strictly followed during the experiments as required by the Midi-Pyrénées ethics committee for animal experiments in Toulouse, France. The study was authorized with permit number APAFIS#5921-2016070118008477v3.

Acute oral toxicity assessment

Acute oral tests were performed as described before with slight modifications [13]. Mice were randomly divided in 2 groups of 3 mice and treated by oral route with a single dose of *Terminalia albida* (2000 mg/kg) or

water (20 mL/kg) to follow the limit test proposed by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) [16]. Animals were observed for the first 4 h after treatment to record immediate deaths, and once daily for 20 days to record deaths and behavioural changes. To evaluate the effect of *Terminalia albida* treatment on body weight, the weight was taken at Days 7, 14 and 20 and compared to Day 0 for both groups (*Terminalia albida* and water).

In vivo antiplasmodial and anti-malarial effects of *Terminalia albida* in ECM

The rodent malaria parasite, *P. berghei* (strain ANKA) (kindly given by A. Berry, CPTP research unit, Toulouse) was used throughout the study. Mice were infected by intraperitoneal injection with 200 µL of infected blood containing 1 × 10⁶ parasitized erythrocytes on Day 0 (D0). The infected mice were randomly divided into 3 groups of 6 mice and treated by oral gavage for 4 consecutive days with 100 mg/kg of *Terminalia albida* crude extract. The positive control group received chloroquine (5 mg/kg) and the negative control group received distilled water (25 mL/kg). The extracts were administered orally once a day. Weight, parasitaemia, survival and neurological symptoms were followed daily. To evaluate the ability of treatments to prevent weight loss due to infection, the percentages of weight loss as compared to D0 were calculated. Parasitaemia was followed daily through thin blood smears from tail blood from the D3. Blood smears were fixed and stained with a fast-acting variation of May-Grünwald Giemsa staining (RAL 555 kit, RAL Diagnostics). Parasitaemia was determined by light microscopy using a 100 × objective lens as follows: % parasitaemia = 100 × (number of parasitized RBC/total number of RBC counted). Average percentage of antiparasite activity was calculated at D4, D6, D7 and D8 as [(A – B)/A] × 100 where A is the average percentage parasitaemia in the negative control group (H₂O) and B is the average percentage parasitaemia in the test group. To monitor the onset of neurological symptoms, 10 parameters were assessed daily between D3 and D7 to determine a rapid murine cerebral behaviour scale (RMCBS) as described by Carroll et al. [17]. The parameters measured were: gait, balance, exploratory behaviour, grooming, body position, limb strength, tactile escape reflex, ear pavilion reflex, toe reflex and aggressiveness. Each parameter was scored 0 to 2, with a 2 score correlating with the highest function. Survival was monitored twice daily. The percentage of survival was determined over a period of 20 days post-infection and compared between groups.

Brain cell analysis by flow cytometry

After 7 days of infection, mice brains were removed and crushed in PBS^{-/-} (3 mice per group), centrifuged, filtered (100 μ M) and mononuclear cells were separated over a Lymphoprep gradient (Alere Technologies AS, Oslo, Norway), and total leucocytes per brain counted. Isolated brain leucocytes were labelled with antibodies coupled to fluorochromes (all from Miltenyi Biotec, France) to distinguish the different T cell populations: CD3-PE (lymphocytes), CD4-VioBright FITC (CD4 T Lymphocytes), CD8-VioGreen (CD8 T Lymphocytes) and Live dead-Violet (dead cells). Cells were collected on a LSR Fortessa cytometer (BD Biosciences) using FACS-Diva™ software.

Gene expression of pro- and anti-inflammatory markers in mice brains

To measure the effect of *Terminalia albida* treatment on the inflammatory response in *P. berghei*-infected mice, the mice were divided into 3 groups of 6 mice, infected and treated with *Terminalia albida* crude extract, chloroquine or distilled water, as before. Mice were sacrificed 7 or 8 days after infection (D7 or D8). Mice brains were dissected and divided longitudinally into two equal parts to be used for RT-qPCR and ELISA experiments. Half of the brain was placed in lysing matrix tubes (MP Biomedicals) containing 650 μ L of RLT lysis buffer (from the EZ-10 Spin Column Total

RNA Minipreps Super Kit, Bio Basic). The brains were crushed in a FastPrep®-24 (MP) and centrifuged for 10 min. mRNA was prepared with the EZ-10 Spin Column Total RNA Minipreps Super Kit (Bio Basic) using the manufacturer's protocol. Synthesis of cDNA was performed according to the manufacturer's recommendations (Verso kit, Thermo Scientific). RT-qPCR was performed on a LightCycler 480 system using LightCycler SYBR Green I Master Mix (Roche Diagnostics). The primers (Eurogentec) were designed with the software Primer 3. GAPDH mRNA was used as the invariant control. Serially diluted samples of pooled cDNA were used as external standards in each run for the quantification. The primers used are listed in Table 1.

Levels of cytokines in mice brains

The remaining half of the brain was crushed in PBS between two glass slides and filtered through a 100 μ M sterile filter. After centrifugation (1 min at 10,000g and room temperature), the remaining pellet was homogenized in 5 mL IGEPAL, a protease inhibitor solution, and stored at -80°C until use. The levels of IL-6, TNF, IL-1 β , and IL-10 were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using commercially available OptiEIA murine kits (BD Biosciences) according to the manufacturers' instructions.

Table 1 Sequences of murine primers used in quantitative RT-PCR experiments

Gene	Sense	Antisense	Product size (bp)
GAPDH	5'-ACA-CAT-TGG-GGG-TAG-GAA-CA	5'-AAC-TTT-GGC-ATT-GTG-GAA-GG	222
IL-1 β	5'-GAT-CCA-CAC-TCT-CCA-GCT-GCA	5'-CAA-CCA-ACA-AGT-GAT-ATT-CTC-GAT-G	151
TNF	5'-CTC-CCT-TTG-CAG-AAC-TCA-GG	5'-AGC-CCC-CAG-TCT-GTA-TCC-TT	211
HO-1	5'-CCA-GAG-TGT-TCA-TTC-GAG-CA	5'-CAC-GCA-TAT-ACC-CGC-TAC-CT	174
IL-12	5'-TGG-TTT-GAT-GAT-GTC-CCT-GA	5'-AGG-TCA-CAC-TGG-ACC-AAA-GG	172
IFN γ	5'-TGA-GCT-CAT-TGA-ATG-CTT-GG	5'-ACT-GGC-AAA-AGG-ATG-GTG-AC	236
CD11b	5'-AGA-TCG-TCT-TGG-GAG-ATG-CT	5'-GAC-TCA-GTC-AGC-CCC-ATC-AT	169
TLR ₂	5'-TGT-AAC-GCA-ACA-GCT-TCA-GG	5'-TGC-TTT-CCT-GCT-GGA-GAT-TT	196
ICAM-1	5'-AGC-TTG-CAC-GAC-CCT-TCT-AA	5'-AGC-ACC-TCC-CCA-CCT-ACT-TT	159
GranzB	5'-GCT-TCA-CAT-TGA-CAT-TGC-GC	5'-AGA-ACA-GGA-GAA-GAC-CCA-GC	172
NF κ B	5'-ACC-GAA-GCA-GGA-GCT-ATC-AA	5'-GCG-TAC-ACA-TTC-TGG-GGA-GT	178
PGEs	5'-CAG-CCT-ATT-GTT-CAG-CGA-CA	5'-CCT-AGG-CCT-CAG-CCT-CAC-AC	157
TGF β	5'-GAC-TCT-CCA-CCT-GCA-AGA-CC	5'-ACG-CGG-GTG-ACC-TCT-TTA G	246
CD36	5'-GAG-CAA-CTG-GTG-GAT-GGT-TT	5'-GCA-GAA-TCA-AGG-GAG-AGC-AC	206
iNOS	5'-ACA-AGG-CCT-CCA-ATC-TCT-GC	5'-TCC-TGG-ACA-TTA-CGA-CCC-CT	95
VEGF	5'-GCT-GTA-ACG-ATG-AAG-CCC-TG	5'-CGC-TCC-AGG-ATT-TAA-ACC-GG	236
<i>P. berghei</i>	5'-TCA-TTG-GGC-TCT-CAA-AGG-GT	5'-CAA-TTG-GAG-GGC-AAG-TCT-GG	209

Gene expression of pro- and anti-inflammatory markers by murine macrophages after LPS/IFN γ activation and *Terminalia albida* treatment

Peritoneal macrophages were harvested from 6 healthy mice. The peritoneal cavity of each mouse was washed with 5 mL of sterile NaCl 0.9% before harvesting resident peritoneal cells. Collected cells were centrifuged at 1500 rpm for 10 min and the cell pellet was suspended in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen) supplemented with glutamine (Invitrogen), penicillin, streptomycin (Invitrogen) and 5% heat-inactivated fetal calf serum. Cells (5×10^5 /well) were left to adhere for 2 h at 37 °C and 5% CO $_2$, and non-adherent cells were removed by washing with PBS. After washing, adherent macrophages were immediately stimulated with 10 ng/mL lipopolysaccharide (LPS) and 40 UI/mL IFN γ (Clinisciences) during 2 h. After stimulation, cells were washed and treated with 10 μ g/mL *Terminalia albida* crude extract diluted in medium or with medium alone for 4 h at 37 °C and 5% CO $_2$. The dose of 10 μ g/mL was previously determined by an LDH test showing that this concentration is not toxic to mouse peritoneal macrophages (Additional file 1: Fig. S1). Each condition was tested in triplicate. mRNA extraction, cDNA synthesis and RT-qPCR were performed as described above. The primers used are listed in Table 1.

Levels of cytokines produced by murine macrophages after LPS/IFN γ activation and *Terminalia albida* treatment

After LPS/IFN γ stimulation (10 ng/mL LPS and 40 UI/mL IFN γ) during 2 h, murine peritoneal macrophages were treated with *Terminalia albida* (10 μ g/mL) or medium alone for 24 h at 37 °C and 5% CO $_2$. Each condition was tested in triplicate. The supernatants were then assayed to quantify cytokines (TNF, IL-1 β , IL-6, IL-10) by ELISA using commercially available OptiEIA murine kits (BD Biosciences) according to the manufacturers' instructions.

In vitro ROS production model and *Terminalia albida* scavenging activity

The Light-Up Cell System (LUCS) was used to evaluate the ability of *Terminalia albida* to inhibit the production of ROS by HepG2 cells, as previously described [18]. Briefly, *Terminalia albida* methanolic extract was solubilized in DMSO and 9 serial dilutions were prepared from 1.92 mg/mL to 0.0075 mg/mL. Since DMSO 4% was used to dilute the highest concentration of extract, DMSO 4% was used as negative control. No toxic effect was observed on HEpG2 cells at this concentration. HepG2 cells (75,000/well) were cultured for 24 h in DMEM complemented with 10% FBS and 1% penicillin–streptomycin solution at 37 °C and 5% CO $_2$. The experiments were

carried out in DMEM without SVE. At least two independent experiments were performed on 96-well plates, each in triplicate. Cells were then incubated for 4 h in the presence or not of increased concentrations of *Terminalia albida* extract. Extract dilutions were added by replacing the media. Cells were then treated with the fluorescent marker thiazole orange at 4 μ M for 1 h and fluorescence was measured at 535 nm (emission) during 20 recurrent irradiations at 480 nm (excitation). Antioxidant index (AI) was calculated from the kinetics using the formula $AI = 100 - 100 (0/12 \text{ RFU}_{\text{sample}}/0/12 \text{ RFU}_{\text{control}})$. Dose/response curves were obtained by combining AI as a function of the logarithm (10) of the sample concentration and processed by fit sigmoid according to the equation $AI = A_{\text{imin}} + (A_{\text{imax}} - A_{\text{imin}})/(1 + 10^{(\text{Log}(\text{EC}_{50} - \text{CE})^{\text{HS}}))}$ to determine EC $_{50}$ value.

UHPLC-HRMS profiling

Acquisition of metabolite profiles of *Terminalia albida* methanol extract (1 mg/mL), data processing and statistical analysis were performed as previously described [19].

Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm SEM (standard error of mean) and analysed using Graph Pad Prism software version 6. Comparisons were performed by a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the means multiple comparison method of Bonferroni–Dunnnett. Mann–Whitney U-test was used for two-by-two comparisons. Differences were considered significant if $P < 0.05$.

Results

Acute oral toxicity assessment and determination of the test dose

Terminalia albida administration to C57BL/6 mice at a dose of 2000 mg/kg did not cause mortality or major behavioural changes among experimental animals during the 20 days of follow-up. Mice body weight was not modified by the administration of *Terminalia albida* (Additional file 2: Fig. S2). Thus, LD50 of *Terminalia albida* is greater than 2000 mg/kg in C57BL/6 mice. *Terminalia albida* crude extract, as prepared in this work, can therefore be classified as category 5 and considered non-toxic orally, according to the OECD's Globally Harmonized System of Classification [16]. Based on these results, anti-malarial activity in ECM was assessed at 100 mg/kg.

In vitro and in vivo antiplasmodial activity

Terminalia albida crude extract presented an IC $_{50}$ of 1.5 μ g/ml and IC $_{50}$ for chloroquine was 0.08 μ M on the chloroquine-resistant K1 strain of *P. falciparum*. In vivo, mice that received water were parasitized from D4, while mice treated with *Terminalia albida*

were positive from D7. Mice that received water were all dead at D8. At D4, parasite chemosuppression by *Terminalia albida* was 100% and this complete inhibition lasted until D6. At D7, *Terminalia albida* treatment resulted in parasite suppression of 89% compared to water (Fig. 1a, b, $P < 0.0001$). However, *Terminalia albida* treatment did not limit parasite multiplication since parasitaemia increased until 7% at D20. Conversely, chloroquine treatment abolished parasite multiplication (Fig. 1a, b).

Effect of *Terminalia albida* treatment on survival, weight and neurologic symptoms in ECM

Terminalia albida treatment greatly improved survival as chloroquine and *Terminalia albida* treatments were statistically similar until D20 although Fig. 2a suggests that *Terminalia albida* treatment was less effective than chloroquine from D12 onwards. At D20, chloroquine was statistically more effective than *Terminalia albida* treatment (Fig. 2a, $P = 0.045$). *Terminalia albida* treatment prevented death up to D12 and maintained a 50% survival rate at D20 (Fig. 2a. $P = 0.003$ at D8, $P = 0.0005$ from D9 to D13, and $P < 0.05$ until D20 for the comparison between *Terminalia albida* and water). *Terminalia albida* treatment improved the overall condition of the mice since the treated group lost less weight than the water group (the groups were compared up to D7 only because the group that received water had only one living mouse left on D8. $P = 0.037$ at D7. Figure 2b). The comparison of RMCBS between groups showed a rapid deterioration of cerebral functions in untreated mice from D5 (Fig. 2c). Although mice treated with *Terminalia albida* had slightly impaired brain functions at D6 and D7, there was no statistical difference between

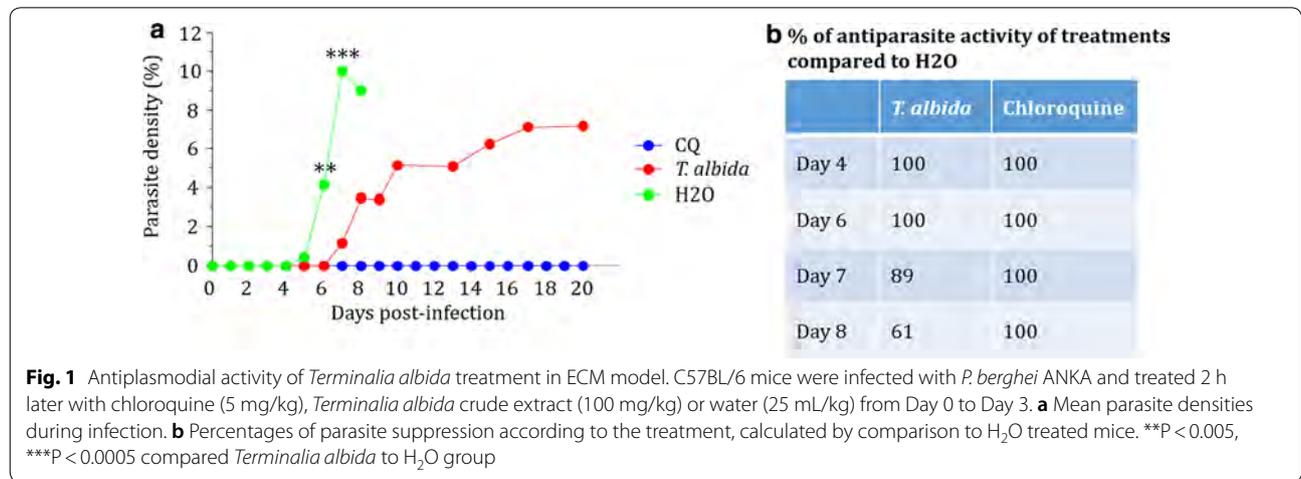
the scores of the CQ and *Terminalia*-treated mice at D6 and D7 (Fig. 2c).

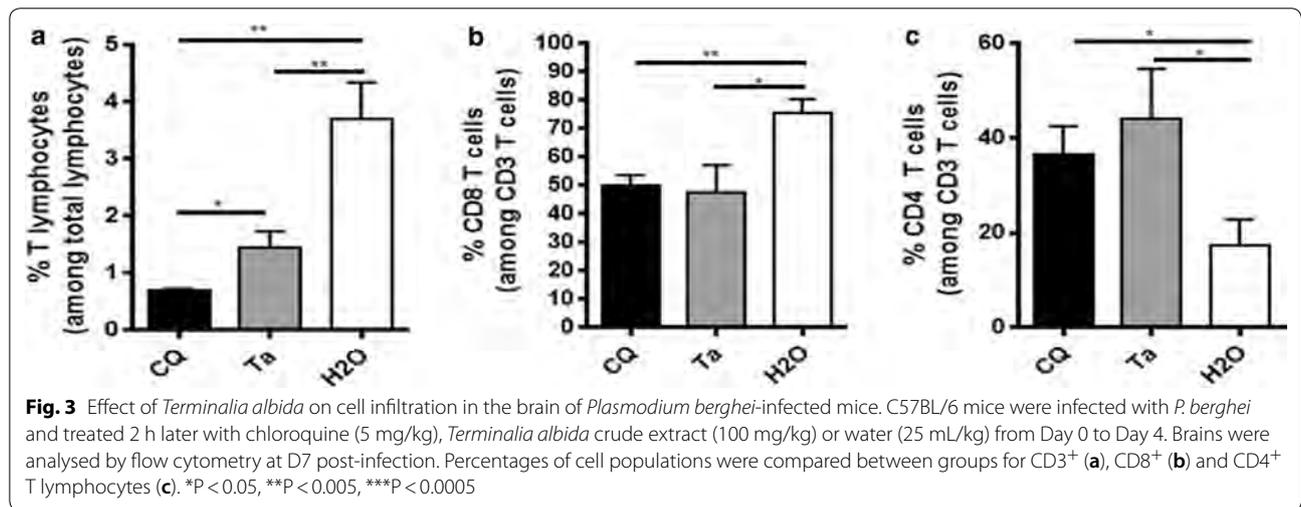
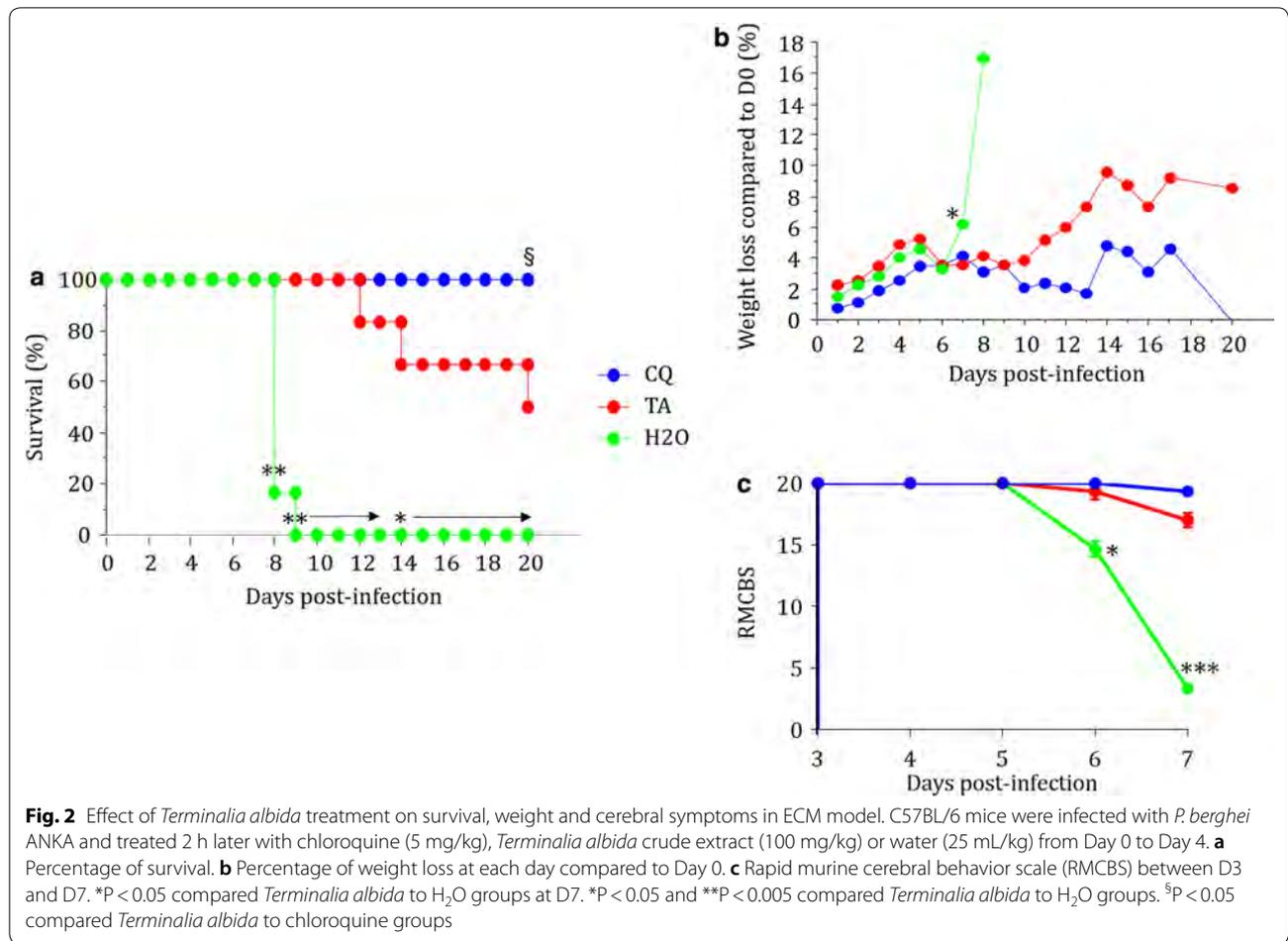
Effect of *Terminalia albida* on T cell infiltration in the brain of *Plasmodium berghei*-infected mice

Leucocyte recruitment and activation in the brain is one of the key mechanisms of ECM, particularly CD8 effector T cells [20]. To assess such mechanism of *P. berghei*-infected mice according to the treatment received (chloroquine or *Terminalia albida* or H₂O), the percentages of the different T cell populations were compared in brains after 7 days of infection by flow cytometry. Interestingly, the percentages of CD3 T and CD3 CD8 T cells in brain was lower in mice treated with chloroquine or *Terminalia albida* extract, compared to mice that received water (Fig. 3a, b). Conversely, the percentage of CD4 T cells was higher in chloroquine and *Terminalia albida*-treated mice, compared to water-treated mice (Fig. 3c, $P = 0.04$ for both comparisons).

Absence of pro-inflammatory response in brains of *Terminalia albida*-treated mice during ECM

To assess the immunological state of brains from *Terminalia albida*-treated mice during ECM, mRNA levels of pro- and anti-inflammatory markers were measured in the 3 groups of mice (*Terminalia albida*, chloroquine and H₂O). *Plasmodium berghei* mRNA was undetectable at D7 in brains of chloroquine and *Terminalia albida*-treated mice (Fig. 4a). The expression of VEGF, a marker of vascular permeability and endothelial activation, was lowered in the chloroquine group compared to the water group (Fig. 4a). Conversely, the expression of ICAM-1, another marker of endothelial activation was diminished in brains of mice treated with *Terminalia albida* (Fig. 4a, $P = 0.002$). Among the pro-inflammatory





cytokines tested, IFN γ expression was completely abolished in mice treated with *Terminalia albida* similarly to the chloroquine group, in comparison to untreated

mice (Fig. 4b. P=0.006 and P=0.005 for *Terminalia albida* versus H₂O and chloroquine versus H₂O, respectively). Interestingly, *Terminalia albida* treatment also

(See figure on next page.)

Fig. 4 Effect of *Terminalia albida* treatment on the expression of pro- and anti-inflammatory markers in brains of *Plasmodium berghei*-infected mice. C57BL/6 mice were infected with *P. berghei* and treated with chloroquine (5 mg/kg), *Terminalia albida* (100 mg/kg) or water. Brains were harvested at D7 (for *P. berghei* and VEGF) or D8 post-infection (for the other markers). Gene expression was measured by RT-qPCR and cytokine levels were measured by ELISA. Gene expression levels of **(a)** *P. berghei*, VEGF, ICAM and Granzyme B; **(b)** pro-inflammatory cytokines, **(c)** other pro-inflammatory markers, and **(d)** anti-inflammatory markers. **(e)** Cytokine levels in pg/mL. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.0005$. Data presented are mean \pm standard deviation

significantly limited the expression of granzyme B similarly to chloroquine (Fig. 4a. $P = 0.003$ and 0.002 for H_2O versus *Terminalia albida* and versus chloroquine). For TNF, IL-1 β and IL-12 expression, the effect of *Terminalia albida* treatment compared to chloroquine or H_2O was not significant (Fig. 4b). Among the other pro-inflammatory markers tested, *Terminalia albida* treatment also diminished CD11b expression similarly to chloroquine (Fig. 4b, $P = 0.006$). Finally, for TLR2, NF κ B, PGES and anti-inflammatory markers (TGF β , CD36 and haem oxygenase 1 named HO-1), *Terminalia albida* treatment had no significant effect (Fig. 4c, d). Cytokine levels were also measured in brains on D8. However, cytokine levels were similar regardless of the treatment received by the mice (Fig. 4e).

Anti-inflammatory properties of *Terminalia albida* in a non-malarial context

To further confirm the anti-inflammatory properties of *Terminalia albida* assessed in the ECM model, additional experiments were performed by stimulating the peritoneal macrophages of C57BL/6 healthy mice with LPS and IFN and treating them with the methanolic extract of *Terminalia albida*. The expression of several pro-inflammatory markers was decreased following treatment of the cells with *Terminalia albida* compared to untreated cells: TNF ($P = 0.04$), IL12 ($P = 0.003$), NF κ B ($P = 0.005$) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) ($P = 0.001$) (Fig. 5a, c). Notably, CD36 and HO-1, two anti-inflammatory markers, were more expressed by *Terminalia albida*-treated cells (Fig. 5d, $P = 0.001$ and $P = 0.01$, respectively). In addition, a significant decrease was also obtained in the enzymatic quantification of TNF, IL-6 and IL-1 β for *Terminalia albida* treated-cells (Fig. 5e, $P = 0.001$, $P = 0.02$ and $P = 0.03$, respectively).

Anti-oxidative properties of *Terminalia albida*

The evaluation of *Terminalia albida*'s ability to neutralize intracellular radical species of the human HepG2 cells showed a remarkable dose-dependent antioxidant activity (Fig. 6a). The antioxidant index (AI) calculated from the area under curves was 997 at concentrations greater than or equal to 60 μ g/mL (Fig. 6b). The EC₅₀ of the extract was 10.2 μ g/mL. Finally, the absence of a

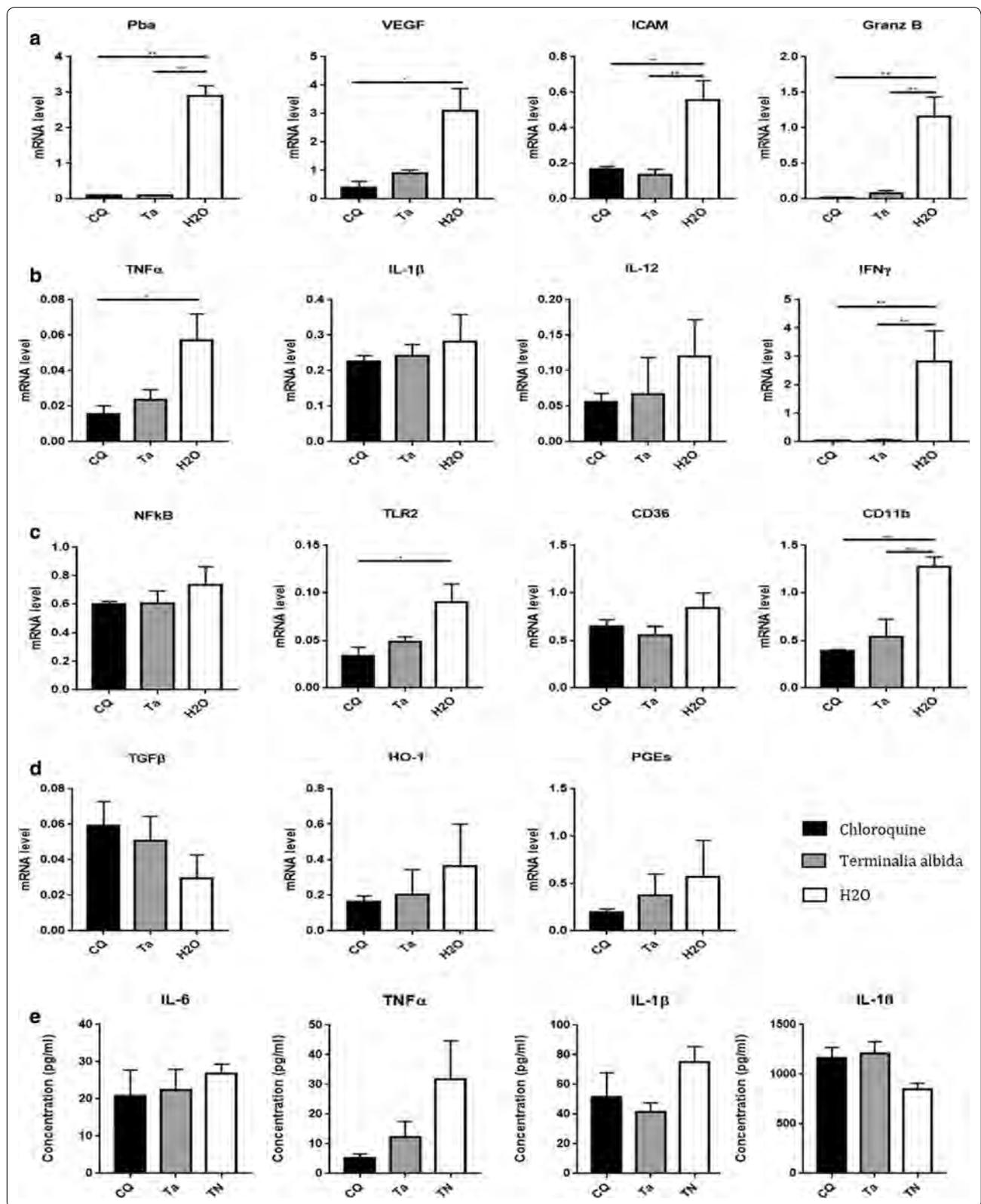
fluorescent signal higher than the control at time 0 indicates an absence of cytotoxicity at 4 h of treatment.

Phytochemical characterization of the *Terminalia albida* crude extract

After maceration with methanol for 72 h, 253.5 g of crude extracts were obtained. The extracts were qualitatively analysed by UHPLC-HRMS. Metabolite profiling of *Terminalia albida* was acquired in positive and negative ionization mode. Qualitative analysis by UHPLC-HRMS of *Terminalia albida* stem bark enabled the putative identification of 16 known compounds through HRMS and MS/MS fragmentation patterns using MzMine, MS-DIAL and MS-FINDER software (Table 2). Among the top 12 annotated compounds, 6 are tannins (flavogallonic acid, flavogallonic acid-Me ester, ellagic acid, ellagic acid 3,8-di-Me ether, corilagin, ellagic acid; 2,3,7-tri-me ether), 4 are triterpenoids (23-O-galloylarjunolic acid 28-O- β -D-glucopyranosyl ester, 23-galloylarjunolic acid, 23-galloylterminolic acid, 7-beta-hydroxy-23-deoxojessic acid), 1 is phenol glucoside gallate (vanillic acid 4-(6-galloylglucoside)) and 1 is cycloartanols and derivatives (ouadrangularic acid F).

Discussion

In this study, the anti-malarial and antiparasite activity of *Terminalia albida* found respectively in ECM and in vitro was high. In vivo, mice survived until D12, the limit for neurological symptoms in this model, and there was a 50% rate after 20 days of infection, while untreated mice were all dead by D8. Such a result obtained with a crude plant extract is quite remarkable when compared to many other similar studies (performed with crude plant extracts at doses ≤ 300 mg/Kg) in which mean mice survival often did not exceed 9 days [21–23]. Antiparasite activity was also very high in vivo, 100% at D4 and until D6, 89% at D7, and 61% at D8. Interestingly, mice treated with *Terminalia albida* have developed a parasitaemia that remained below 8% until D20, while the average parasitaemia of untreated mice reached 10%. This result may be explained by the pharmacokinetics of the active principle(s) responsible for the antiparasite activity. Further bio-guided fractionation is needed to decipher the reasons of such activity.



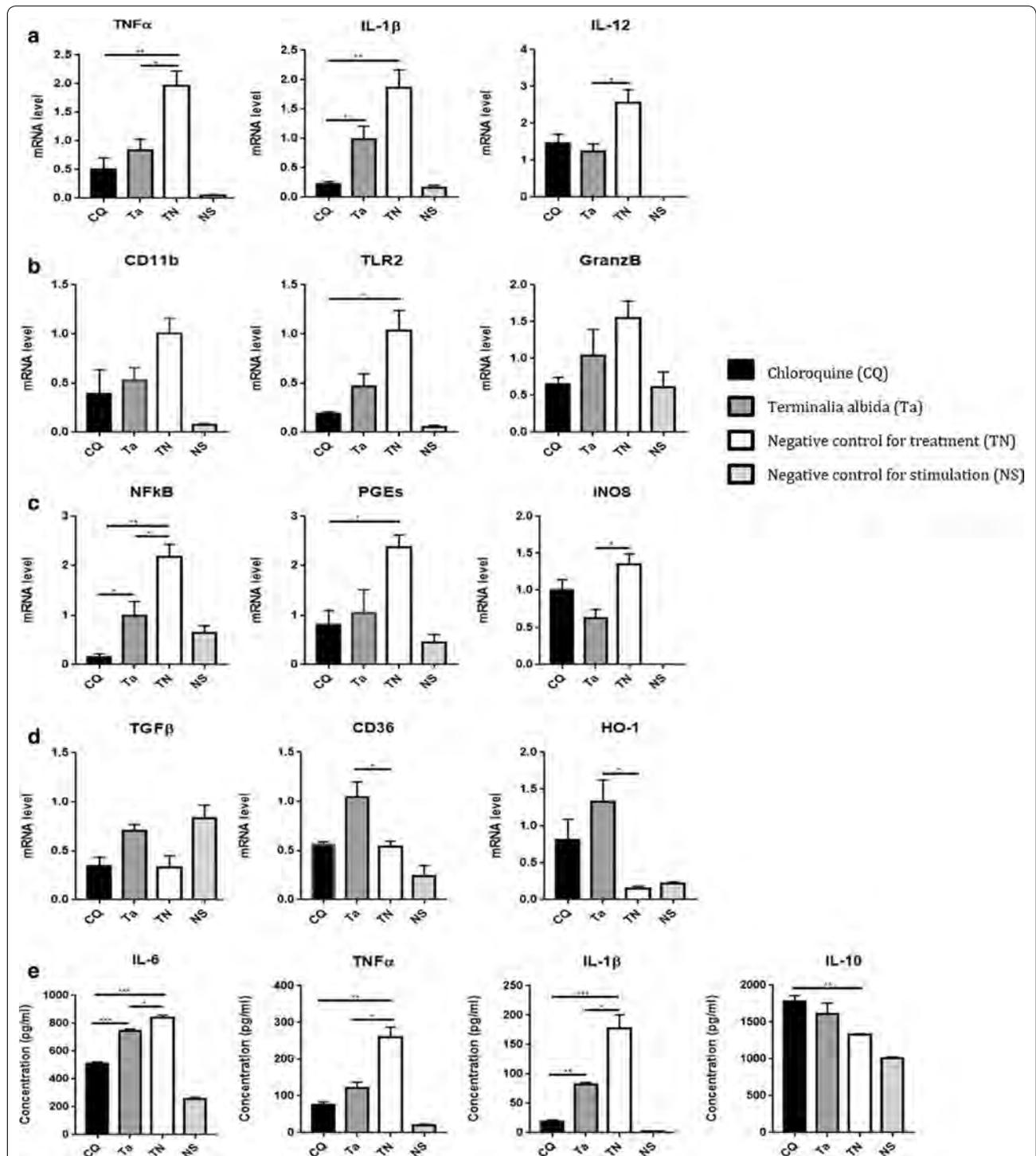
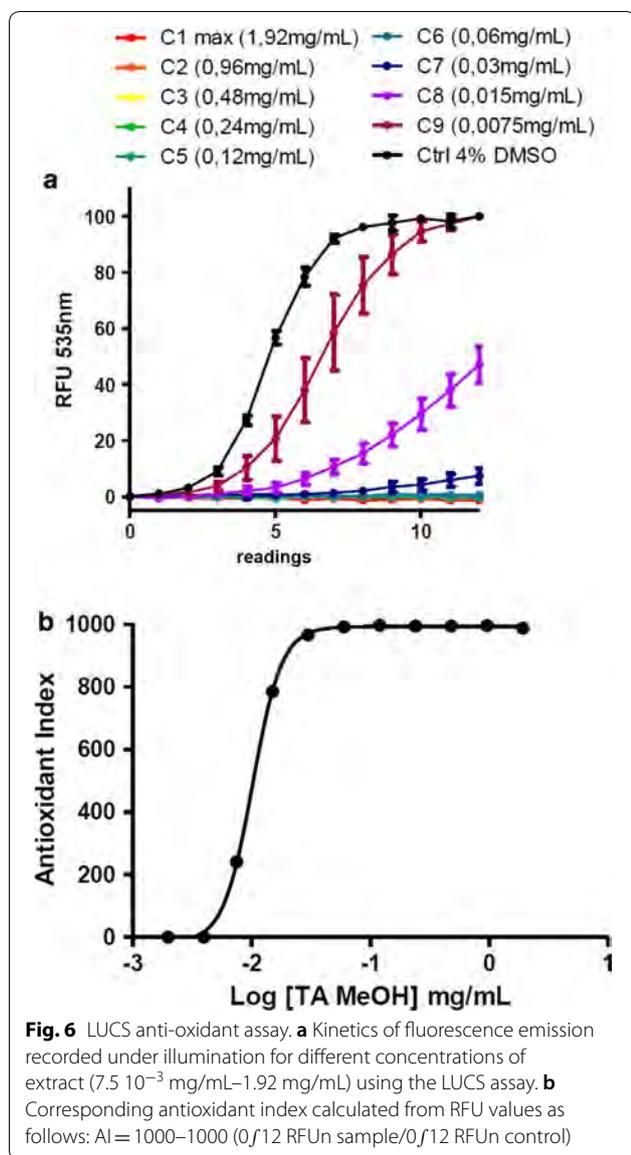


Fig. 5 Assessment of in vitro anti-inflammatory properties of *Terminalia albida*. Murine macrophages were activated by LPS and IFN γ in the presence or not of 10 μ g/mL of *Terminalia albida*. Gene expression levels of **a** pro-inflammatory cytokines, **b** other pro-inflammatory markers, **c** pro-inflammatory signalling pathways, and **d** anti-inflammatory markers. **e** Cytokine levels measured in supernatants, in pg/mL. *P < 0.05, **P < 0.005, ***P < 0.0005. Data are presented as mean \pm SD



In addition, antiparasite activity found in vitro was also interesting with an IC₅₀ of 1.5 µg/ml. This value is slightly higher than that of 0.6 µg/mL, previously found by Traore et al. in 2014 [12]. This difference may be due to the disparity of harvesting locations, harvest time, and extraction methods that influence plant biological active compounds [24]. In addition, Traore et al. used the lactate dehydrogenase assay to measure antiplasmodial activity whereas a Sybr green assay was used in the present study. These different methods may also explain the small disparities between the two studies.

In this research, the aim was to elucidate whether, in addition to its antiparasitic properties, *Terminalia albidia* presents anti-inflammatory and anti-oxidant activities useful for the resolution of cerebral malaria.

During malaria, the first immune responses (oxidative and inflammatory) induced by monocytes are essential to control parasite multiplication. However, excessive and inappropriate activation of the immune system is detrimental to the host and contributes to the severe form that can lead to death [25]. Mechanisms leading to ECM involve the recruitment of T lymphocytes to the brain, particularly CD8 T cells known to be responsible for lethal neuropathology [8]. In the ECM model, treatment with *Terminalia albidia*, similarly to chloroquine, greatly restrained the recruitment of T cells and more specifically of CD8 T cells in mice brains after 7 days of infection. It seems logical since at D7, the parasitaemia of the treated mice was very low and the parasite mRNA undetectable.

Here, brains from infected mice treated with the methanolic extract of *Terminalia albidia* showed reduced expression of IFN γ , CD11b, ICAM-1 and granzyme B. The secretion of IFN γ by NK cells contributes to the CM pathogenesis by increasing the expression of endothelial receptors including ICAM-1 and VCAM involved in the sequestration of parasitized red blood cells in the murine model [26]. This phenomenon induces the activation of endothelial cells by excessive production of pro-inflammatory cytokines such as TNF, IL-6, IL-1 β , IL-12 and the recruitment of inflammatory leukocytes in the cerebral micro-vessels that damage the blood–brain barrier [25]. CD11b constitutes a marker of brain endothelium disruption, as described before [27]. In addition, CD8+ T cells have been identified as a major mediator in death during ECM by their capacity to produce granzyme B able to kill *P. berghei* antigen-presenting endothelial cells and to damage neuronal cells [8]. Thus, during ECM, *Terminalia albidia* treatment not only limits parasitaemia but also reduces the expression of mediators involved in pathogenesis. Such anti-inflammatory properties were confirmed in vitro in a non-malarial context. After LPS/IFN γ stimulation in murine peritoneal macrophages, *Terminalia albidia* treatment led to a significant inhibition of the expression of TNF, IL-1 β , IL-6 and IL12, four pro-inflammatory cytokines. NF κ B, the transcription factor regulating the inflammatory response has been suggested as therapeutic target to treat severe malaria [28]. In the present study, NF κ B was also less expressed by cells treated with the plant compared to untreated cells. Similarly, CD36, an important marker for malaria, was higher in treated cells compared to untreated ones (Fig. 4). Through PPAR γ activation, the scavenger receptor CD36 is known for its implication in *P. berghei* elimination through non-opsonic phagocytosis [29].

Terminalia albidia also presented highly interesting antioxidant properties in vitro. LPS/IFN γ -activated cells treated with *Terminalia albidia* showed a lower

anti-inflammatory and immunomodulatory effects [47, 48]. They are excellent anti-oxidants due to the presence of a hydroxyl group capable of capturing oxygen free radicals [49]. In addition to anti-*Plasmodium* activity, ellagic acid has known anti-oxidant and anti-inflammatory activity that could explain the higher survival rate obtained after *Terminalia albida* treatment in ECM [47, 50]. In a model of carrageenan-induced inflammation, ellagic acid prevented the production of pro-inflammatory mediators and promoted the production of anti-inflammatory IL-10 and antioxidant glutathione [51]. Eschweilenol C has also been reported for anti-inflammatory activity in the aqueous extract of *Terminalia fagifolia* by inhibition of NFκB pathway in LPS-activated microglial cells [48]. Corilagin has also been studied for its anti-inflammatory activity based on the inhibition of the NFκB signaling pathway and even tested as a treatment in a model of sepsis [52–54]. Anti-inflammatory and anti-oxidant effects of a derivative of vanillic acid, vanillic acid 4-(6-galloylglucoside), were also reported both in vitro and in vivo in the carrageenan-based inflammation murine model [55, 56]. Finally, cyclic triterpenes are also a phytochemical group with various biological activities, particularly in inflammatory and oxidative diseases [57]. Nevertheless, further bioassay-guided fractionation will be necessary to confirm the origin of the antiplasmodial, anti-inflammatory and anti-oxidant activities of *Terminalia albida*, including synergistic potential between tannins, lignans and terpenoids found in this plant.

Conclusion

Terminalia albida displays highly interesting anti-malarial, anti-inflammatory and anti-oxidant properties. UHPLC-HRMS analysis showed that 12 compounds are found in *Terminalia albida* and may be implicated in its biological activities. However, further investigations into the long-term toxicity, prophylactic effects and antiparasite mechanisms are necessary before recommending the use of *Terminalia albida* or its constituents for malaria treatment or prevention.

Supplementary information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1186/s12936-019-3071-9>.

Additional file 1: Fig. S1. *Terminalia albida* cytotoxicity against healthy murine peritoneal macrophages by the lactate dehydrogenase (LDH) test. Cells ($2 \cdot 10^5$ /well) were left to adhere for 2 h at 37 °C and 5% CO₂, and non-adherent cells were removed by washing with PBS. Adherent cells were treated with serial dilutions of *Terminalia albida* extract (100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL) and incubated at 37 °C and 5% CO₂ for 24 h. LDH leakage from the cells was determined using a commercial LDH cytotoxicity detection kit according to the manufacturer's protocols (Cytotoxicity detection Kit, Roche, France). Absorbance was measured at 490 nm with a Wallac Victor 2 1420 Multilabel Counter. Cell

mortality was calculated as a percentage: (absorbance of wells treated with extract *100/absorbance of wells treated with triton).

Additional file 2: Fig. S2. Acute oral toxicity test in vivo: effect of *Terminalia albida* treatment on body weight. Mice were treated by oral route with a single dose of *Terminalia albida* (2000 mg/kg) or water (20 mL/kg). To evaluate the effect of *Terminalia albida* treatment on body weight, the weight was taken at D7, D14 and D20 and compared to D0 for both groups (*Terminalia albida* and water).

Abbreviations

CD: cluster of differentiation; CPTP: Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan; ECM: experimental cerebral malaria; HepG2: liver hepatocellular cells G2; HO-1: haem oxygenase-1; IC50: 50% inhibitory concentration; ICAM-1: intercellular adhesion protein 1; iEs: infected erythrocytes; IFNγ: interferon gamma; IL: interleukin; iNOS: nitric oxide synthase; LC/MS: liquid chromatography–mass spectrometry; LD50: 50% lethal dose; LPS: lipopolysaccharide; NFκB: nuclear factor-kappa B; NK: natural killer; OECD: Organization for Economic Cooperation and Development; PPARγ: peroxisome proliferator-activated receptor; ROS: reactive oxygen species; TNF: tumor necrosis factor; VCAM-1: vascular cell adhesion protein 1.

Acknowledgements

we thank Melissa Parry who kindly provided us with ELISAs reagents.

Authors' contributions

AMB, AA and AiC designed the study and wrote the publication with the help of AC. MST, AOB and ESB performed the field work. AiC carried out most of the in vitro and in vivo lab experiments with the help of JR. MAB evaluated the in vitro anti-malarial activity of the extracts and analysed the results. PB and MaH helped for murine models. MoH managed the dereplication approach and KR the Light-Up Cell System to measure *Terminalia albida* scavenging activity. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

A. Camara received funding for her PhD research from the French Embassy in Guinea (Grant No. 001) and from the Guinean Ministry of Higher Education and Scientific Research (Grant No. 001).

Availability of data and materials

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Ethics approval and consent to participate

Mice studies (oral toxicity tests and anti-malarial in vivo evaluation) were approved by the Midi-Pyrénées ethic committee for animal experimentation in Toulouse, France. The study was authorized with the permit number APAFIS#5921-2016070118008477 v3.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹ UMR152 PHARMADEV, IRD, UPS, Université de Toulouse, Toulouse, France.

² Institute for Research and Development of Medicinal and Food Plants of Guinea (IRDPMAG), Dubréka, Guinea. ³ Department of Pharmacy, University Gamal Abdel Nasser of Conakry, Conakry, Guinea. ⁴ Department of Pharmacy, University of Sciences, Technics and Technologies (USTTB) of Bamako, Bamako, Mali.

Received: 11 September 2019 Accepted: 11 December 2019

Published online: 18 December 2019

References

1. WHO. World malaria report. Geneva: World Health Organization; 2017.

2. Ashley EA, Dhorda M, Fairhurst RM, Amaratunga C, Lim P, Soun S, et al. Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med*. 2014;371:411–23.
3. Ikeda M, Kaneko M, Tachibana S-I, Balikagala B, Sakurai-Yatsushiro M, Yatsushiro S, et al. Artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* with high survival rates, Uganda, 2014–2016. *Emerg Infect Dis*. 2018;24:718–26.
4. Lu F, Culleton R, Zhang M, Ramaprasad A, von Seidlein L, Zhou H, et al. Emergence of indigenous artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in Africa. *N Engl J Med*. 2017;376:991–3.
5. Dondorp AM, Fanello CI, Hendriksen ICE, Gomes E, Seni A, Chhaganlal KD, et al. Artesunate versus quinine in the treatment of severe *falciparum* malaria in African children (AQUAMAT): an open-label, randomised trial. *Lancet*. 2010;376:1647–57.
6. Storm J, Craig AG. Pathogenesis of cerebral malaria-inflammation and cytoadherence. *Front Cell Infect Microbiol*. 2014;4:100.
7. White NJ, Turner GDH, Day NPJ, Dondorp AM. Lethal malaria: Marchiafava and Bignami were right. *J Infect Dis*. 2013;208:192–8.
8. Howland SW, Poh CM, Rénia L. Activated brain endothelial cells cross-present malaria antigen. *PLoS Pathog*. 2015;11:e1004963.
9. Becker K, Tilley L, Vennerstrom JL, Roberts T, Rogerson S, Ginsburg H. Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. *Int J Parasitol*. 2004;34:163–89.
10. Aguilar R, Marrocco T, Skorokhod OA, Barbosa A, Nhabomba A, Manaca MN, et al. Blood oxidative stress markers and *Plasmodium falciparum* malaria in non-immune African children. *Br J Haematol*. 2014;164:438–50.
11. Oujii M, Augereau J-M, Paloque L, Benoit-Vical F. *Plasmodium falciparum* resistance to artemisinin-based combination therapies: a sword of Damocles in the path toward malaria elimination. *Parasite*. 2018;25:24.
12. Traore MS, Diane S, Diallo MST, Balde ES, Balde MA, Camara A, et al. *In Vitro* antiprotozoal and cytotoxic activity of ethnopharmacologically selected Guinean plants. *Planta Med*. 2014;80:1340–4.
13. Haidara M, Haddad M, Denou A, Marti G, Bourgeade-Delmas S, Sanogo R, et al. *In vivo* validation of anti-malarial activity of crude extracts of *Terminalia macroptera*, a Malian medicinal plant. *Malar J*. 2018;17:68.
14. Traore MS, Baldé MA, Diallo MST, Baldé ES, Diané S, Camara A, et al. Ethnobotanical survey on medicinal plants used by Guinean traditional healers in the treatment of malaria. *J Ethnopharmacol*. 2013;150:1145–53.
15. Smilkstein M, Sriwilaijaroen N, Kelly JX, Wilairat P, Riscoe M. Simple and inexpensive fluorescence-based technique for high-throughput antimalarial drug screening. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48:1803–6.
16. OECD, et al. OECD guidelines for the testing of chemicals, Section 4: health effects. Test no. 425: acute oral toxicity: up-and-down procedure. Paris: OECD Publishing; 2008.
17. Carroll RW, Wainwright MS, Kim K-Y, Kidambi T, Gómez ND, Taylor T, et al. A rapid murine coma and behavior scale for quantitative assessment of murine cerebral malaria. *PLoS One*. 2010;5(10):e13124.
18. Derick S, Gironde C, Perio P, Reybier K, Nepveu F, Jauneau A, et al. LUCS (Light-Up Cell System), a universal high throughput assay for homeostasis evaluation in live cells. *Sci Rep*. 2017;7:18069.
19. Chassagne F, Haddad M, Amiel A, Phakeovilay C, Manithip C, Bourdy G, et al. A metabolomic approach to identify anti-hepatocarcinogenic compounds from plants used traditionally in the treatment of liver diseases. *Fitoterapia*. 2018;127:226–36.
20. Howland SW, Claser C, Poh CM, Gun SY, Rénia L. Pathogenic CD8 + T cells in experimental cerebral malaria. *Semin Immunopathol*. 2015;37:221–31.
21. Hints G, Sibhat GG, Karim A. Evaluation of antimalarial activity of the leaf latex and TLC isolates from *Aloe megalacantha* Baker in *Plasmodium berghei* infected mice. *Evid-Based Complement Altern Med*. 2019;2019:6459498.
22. Mzena T, Swai H, Chacha M. Antimalarial activity of *Cucumis metuliferus* and *Lippia kituensis* against *Plasmodium berghei* infection in mice. *Res Rep Trop Med*. 2018;9:81–8.
23. Nureye D, Assefa S, Nedi T, Engidawork E. *In vivo* antimalarial activity of the 80% methanolic root bark extract and solvent fractions of *Gardenia ternifolia* Schumacher & Thonn. (Rubiaceae) against *Plasmodium berghei*. *Evid-Based Complement Altern Med*. 2018;2018:9217835.
24. Conforti F, Marcotullio MC, Menichini F, Statti GA, Vannutelli L, Burini G, et al. The influence of collection zone on glucosinolates, polyphenols and flavonoids contents and biological profiles of *Capparis sicula* ssp. *sicula*. *Food Sci Technol Int*. 2011;17:87–97.
25. Dunst J, Kamena F, Matuschewski K. Cytokines and chemokines in cerebral malaria pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7:324.
26. Amante FH, Haque A, Stanley AC, de Rivera F, Randall LM, Wilson YA, et al. Immune-mediated mechanisms of parasite tissue sequestration during experimental cerebral malaria. *J Immunol*. 2010;185:3632–42.
27. Cahyani WA, Norahmawati E, Budiarti N, Fitri LE. Increased CD11b and hypoxia-inducible factors-1 alpha expressions in the lung tissue and surfactant protein-D levels in serum are related with acute lung injury in severe malaria of C57BL/6 mice. *Iran J Parasitol*. 2016;11:303–15.
28. Tripathi AK, Sha W, Shulaev V, Stins MF, Sullivan DJ. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes induce NF-kappaB regulated inflammatory pathways in human cerebral endothelium. *Blood*. 2009;114:4243–52.
29. McGilvray ID, Serghides L, Kapus A, Rotstein OD, Kain KC. Nonopsonic monocyte/macrophage phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-parasitized erythrocytes: a role for CD36 in malarial clearance. *Blood*. 2000;96:3231–40.
30. Percário S, Moreira DR, Gomes BAQ, Ferreira MES, Gonçalves ACM, Laurindo PSOC, et al. Oxidative stress in malaria. *Int J Mol Sci*. 2012;13:16346–72.
31. Serghides L, Kim H, Lu Z, Kain DC, Miller C, Francis RC, et al. Inhaled nitric oxide reduces endothelial activation and parasite accumulation in the brain, and enhances survival in experimental cerebral malaria. *PLoS One*. 2011;6:e27714.
32. Xu H, Feng Y, Chen G, Zhu X, Pang W, Du Y, et al. L-arginine exacerbates experimental cerebral malaria by enhancing pro-inflammatory responses. *Tohoku J Exp Med*. 2015;236:21–31.
33. Pamplona A, Ferreira A, Balla J, Jeney V, Balla G, Epiphanyo S, et al. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Nat Med*. 2007;13:703–10.
34. Ohashi M, Amoa-Bosompem M, Kwofie KD, Agyapong J, Adegle R, Sakyiamah MM, et al. *In vitro* antiprotozoan activity and mechanisms of action of selected Ghanaian medicinal plants against *Trypanosoma*, *Leishmania*, and *Plasmodium* parasites. *Phytother Res*. 2018;32:1617–30.
35. Mbouna CDJ, Kouipou RMT, Keumoe R, Tchokouaha LRY, Fokou PVT, Tali BMT, et al. Potent antiplasmodial extracts and fractions from *Terminalia mantaly* and *Terminalia superba*. *Malar J*. 2018;17:142.
36. Muganga R, Angenot L, Tits M, Frédéric M. *In vitro* and *in vivo* antiplasmodial activity of three Rwandan medicinal plants and identification of their active compounds. *Planta Med*. 2014;80:482–9.
37. Apel C, Bignon J, Garcia-Alvarez MC, Ciccone S, Clerc P, Grondin I, et al. N-myristoyltransferases inhibitory activity of ellagitannins from *Terminalia bentzoë* (L.) L. f. subsp. *bentzoë*. *Fitoterapia*. 2018;131:91–5.
38. Razak MR, Afzan A, Ali R, Jalaluddin NF, Wasiman MI, Zahari SH, Abdullah NR, Ismail Z, et al. Effect of selected local medicinal plants on the asexual blood stage of chloroquine resistant *Plasmodium falciparum*. *BMC Complement Altern Med*. 2014;14:492.
39. Abiodun O, Gbotosho G, Ajaiyeoba E, Happi T, Falade M, Wittlin S, et al. *In vitro* antiplasmodial activity and toxicity assessment of some plants from Nigerian ethnomedicine. *Pharm Biol*. 2011;49:9–14.
40. Sanon S, Gansane A, Ouattara LP, Traore A, Ouedraogo IN, Tiono A, et al. *In vitro* antiplasmodial and cytotoxic properties of some medicinal plants from western Burkina Faso. *Afr J Lab Med*. 2013;2:81.
41. Ouattara LP, Sanon S, Mahiou-Leddé V, Gansané A, Baghdikian B, Traoré A, et al. *In vitro* antiplasmodial activity of some medicinal plants of Burkina Faso. *Parasitol Res*. 2014;113:405–16.
42. Bagavan A, Rahuman AA, Kamaraj C, Kaushik NK, Mohanakrishnan D, Sahal D. Antiplasmodial activity of botanical extracts against *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Res*. 2011;108:1099–109.
43. Soh PN, Witkowski B, Olagnier D, Nicolau M-L, Garcia-Alvarez M-C, Berry A, et al. *In vitro* and *in vivo* properties of ellagic acid in malaria treatment. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53:1100–6.
44. Akanbi OM, Elekofehinti O, Olatokunbo A, Adejuyigbe A, Jegede A. Anti-malarial activity of total saponins from *Terminalia avicennioides* and its effect on liver and haematological of infected mice. *Drug Des*. 2018;7:2169.
45. Haddad M, Laurens V, Lacaille-Dubois M-A. Induction of apoptosis in a leukemia cell line by triterpene saponins from *Albizia adianthifolia*. *Bioorg Med Chem*. 2004;12:4725–34.

46. Machumi F, Midiwo JO, Jacob MR, Khan SI, Tekwani BL, Zhang J, et al. Phytochemical, antimicrobial and antiplasmodial investigations of *Terminalia brownii*. *Nat Prod Commun*. 2013;8:761–4.
47. Abiodun OO, Rodríguez-Nogales A, Algieri F, Gomez-Caravaca AM, Segura-Carretero A, Utrilla MP, et al. Antiinflammatory and immunomodulatory activity of an ethanolic extract from the stem bark of *Terminalia catappa* L. (*Combretaceae*): *in vitro* and *in vivo* evidences. *J Ethnopharmacol*. 2016;192:309–19.
48. de Araújo A, Iles B, de Nogueira K, Dias J, Plácido A, Rodrigues A, et al. Antifungal and anti-inflammatory potential of eschweilenol C-rich fraction derived from *Terminalia fagifolia* Mart. *J Ethnopharmacol*. 2019;240:111941.
49. Manosroi A, Jantrawut P, Ogiwara E, Yamamoto A, Fukatsu M, Yasukawa K, et al. Biological activities of phenolic compounds and triterpenoids from the galls of *Terminalia chebula*. *Chem Biodivers*. 2013;10:1448–63.
50. Zeb A. Ellagic acid in suppressing *in vivo* and *in vitro* oxidative stresses. *Mol Cell Biochem*. 2018;448:27–41.
51. El-Shitany NA, El-Bastawissy EA, El-desoky K. Ellagic acid protects against carrageenan-induced acute inflammation through inhibition of nuclear factor kappa B, inducible cyclooxygenase and proinflammatory cytokines and enhancement of interleukin-10 via an antioxidant mechanism. *Int Immunopharmacol*. 2014;19:290–9.
52. Zhao L, Zhang SL, Tao JY, Pang R, Jin F, Guo YJ, et al. Preliminary exploration on anti-inflammatory mechanism of corilagin (beta-1-O-galloyl-3,6-(R)-hexahydroxydiphenoyl-D-glucose) *in vitro*. *Int Immunopharmacol*. 2008;8:1059–64.
53. Dong XR, Luo M, Fan L, Zhang T, Liu L, Dong JH, et al. Corilagin inhibits the double strand break-triggered NF-kappaB pathway in irradiated microglial cells. *Int J Mol Med*. 2010;25:531–6.
54. Li H-R, Liu J, Zhang S-L, Luo T, Wu F, Dong J-H, et al. Corilagin ameliorates the extreme inflammatory status in sepsis through TLR4 signaling pathways. *BMC Complement Altern Med*. 2017;17:18.
55. Kim M-C, Kim S-J, Kim D-S, Jeon Y-D, Park SJ, Lee HS, et al. Vanillic acid inhibits inflammatory mediators by suppressing NF-kB in lipopolysaccharide-stimulated mouse peritoneal macrophages. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2011;33:525–32.
56. Calixto-Campos C, Carvalho TT, Hohmann MSN, Pinho-Ribeiro FA, Fattori V, Manchope MF, et al. Vanillic acid inhibits inflammatory pain by inhibiting neutrophil recruitment, oxidative stress, cytokine production, and NFkB activation in mice. *J Nat Prod*. 2015;78:1799–808.
57. Yadav VR, Prasad S, Sung B, Kannappan R, Aggarwal BB. Targeting inflammatory pathways by triterpenoids for prevention and treatment of cancer. *Toxins*. 2010;2:2428–66.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions

