



HAL
open science

**Propriétés antiparasitaires des benzyl-ménadiones :
étude de leur mécanisme d'action et de leur potentiel à
bloquer la transmission des parasites du paludisme au
moustique vecteur *Anopheles gambiae***

Alice-Anne Goetz

► **To cite this version:**

Alice-Anne Goetz. Propriétés antiparasitaires des benzyl-ménadiones : étude de leur mécanisme d'action et de leur potentiel à bloquer la transmission des parasites du paludisme au moustique vecteur *Anopheles gambiae*. Parasitologie. Université de Strasbourg, 2016. Français. NNT : 2016STRAJ115 . tel-03270811

HAL Id: tel-03270811

<https://theses.hal.science/tel-03270811>

Submitted on 25 Jun 2021

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.

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE

U963/UPR9022 - Réponse Immunitaire et développement chez les insectes

THÈSE présentée par :

Alice-Anne GOETZ

soutenue le : 28 novembre 2016

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**
Discipline/ Spécialité : Chimie biologique et thérapeutique, Parasitologie et
Pharmacochimie antiparasitaire

**Propriétés antiparasitaires des benzyl-
ménadiones:**

**Étude de leur mécanisme d'action et de leur
potentiel à bloquer la transmission des parasites
du paludisme au moustique vecteur *Anopheles
gambiae***

THÈSE dirigée par :

BLANDIN Stéphanie

DAVIOUD-CHARVET Élisabeth

Chargée de recherche, université de Strasbourg

Directrice de recherche, université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

MORLAIS Isabelle

MEUNIER Brigitte

Directrice de recherche, IRD Montpellier - France

Chargée de recherche, I2BC Gif-sur-Yvette - France

AUTRES MEMBRES DU JURY :

LESCURE Alain

FRANKE-FAYARD Blandine

Directeur de recherche, IBMC Strasbourg - France

Assistant professor, LUMC Leiden - Pays Bas

INTRODUCTION GENERALE

Le paludisme ou malaria

Le paludisme

Le paludisme aussi appelé malaria est une des maladies parasitaires les plus dévastatrices touchant l'espèce humaine. Avec environ 2000 morts par jour, le paludisme touche essentiellement de jeunes enfants de moins de 5 ans principalement en Afrique où se produisent 90% des cas (N J White, Pukrittayakamee, & Hien, 2013).

Le paludisme sévit dans 108 pays dans les régions tropicales de l'Afrique Sub-Saharienne, de l'Asie et des Amériques du Sud et Centrale, mettant un peu moins de la moitié de la population mondiale sous la menace de ce fléau. Pour l'année 2015, l'OMS estime que le paludisme a touché 214 millions de personnes et aurait fait 438 000 morts (nombre en baisse depuis plusieurs années) (World Health Organization, 2015).

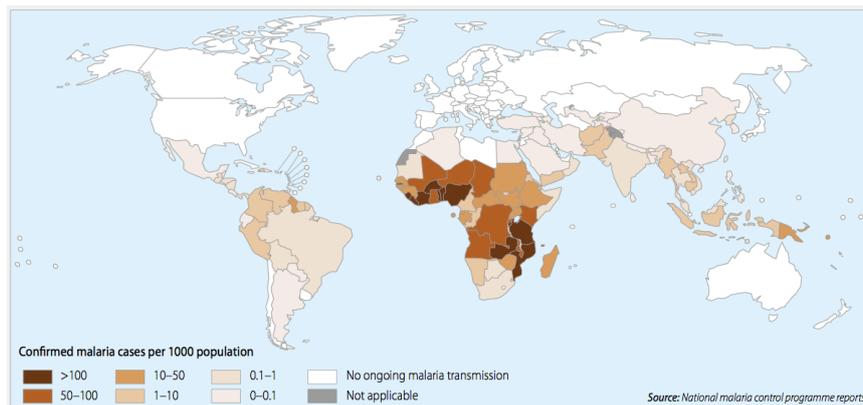


Figure 1 : Cas de paludisme dans le monde (World Health Organization et al., 2014)

Symptômes cliniques du paludisme

Dans les pays endémiques, le paludisme est la première cause de fièvre. Les premiers symptômes sont aspécifiques : maux de tête, fatigue, douleurs musculaires, nausées, vomissements, accompagnés de crises de fièvres. Pour les cas sévères, les crises peuvent aller jusqu'au coma profond (aussi appelé

paludisme cérébral ou neuro-paludisme). La plupart des patients adultes présentent une infection non sévère avec des symptômes physiques modérés. En revanche, chez les jeunes enfants exposés à une transmission stable du parasite, les infections récurrentes peuvent provoquer une anémie chronique ainsi qu'une splénomégalie (N J White et al., 2013). La sévérité des crises est liée à l'âge (Nicholas J White et al., 2014). Les jeunes enfants sont plus à risque de développer une anémie et une hypoglycémie sévères que les adultes qui développent plutôt des oedèmes pulmonaires, des jaunisses et des insuffisances rénales. L'infection devient mortelle lorsque la proportion de globules rouges infectés par un parasite dépasse les 2%. Si l'infection est prise en charge rapidement avec des traitements antipaludéens adaptés, le taux de mortalité est très faible (<0.1%) (N J White et al., 2013).

Un coût économique et social élevé

Cette maladie est un fléau sanitaire de par les morts qu'elle engendre mais c'est aussi un fléau économique. Le paludisme coûte 12 milliards de dollars par an aux pays africains, 25% des revenus des familles et 40% des dépenses de santé publique dans ces mêmes pays. (Vitoria et al., 2009)

La pression du paludisme est exercée sur des pays déjà pauvres et vulnérables. Dans ces pays, les communautés les plus pauvres et marginalisées sont les plus sévèrement touchées de part le manque d'accès aux moyens préventifs, aux diagnostiques ou aux traitements. Ainsi le paludisme est lié à la pauvreté des communautés mais aussi à celle des infrastructures des systèmes de santé publique. (World Health Organization et al., 2014)

Du point de vue socio-économique, le paludisme est un frein pour la croissance économique des pays africains. En plus des pertes économiques directes pour les pays, le paludisme entraîne des frais indirects liés à une perte de productivité due aux arrêts maladie, aux hospitalisations et à la souffrance de la perte de proches. Chez les enfants contractants la maladie, l'absentéisme à l'école entrave leur scolarisation et les séquelles neurologiques peuvent être irréversibles. Le frein économique concerne également les échanges commerciaux, les investissements étrangers et bien sûr le tourisme, enfermant certaines économies dans une spirale infernale.

Facteurs génétiques protecteurs dans les régions endémiques

Chez les patients atteints d'hémoglobinopathies, comme la drépanocytose ou les thalassémies, l'augmentation du stress oxydatif dans l'érythrocyte rend le milieu hostile pour le parasite. Dans les régions endémiques du paludisme, 400 millions de personnes sont déficientes pour la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD). Ce qui coïncidence avec la prévalence du parasite dans ces mêmes régions. En effet le parasite se développe mal dans les normocytes déficients en la G6PD ou déficients pour la GR ou la synthèse *de novo* du GSH.

La G6PD est l'enzyme produisant le cofacteur de la GR, le NADPH. Ainsi un normocyte déficient en G6PD peut être considéré comme naturellement invalidé partiellement de la *hGR*. La déficience en G6PD n'est pas handicapante pour l'Homme mais le protège des cas de paludisme sévère par la faible capacité anti-oxydante du normocyte, délétère pour le développement du parasite. De plus, les cellules infectées et déficientes en G6PD sont plus vite phagocytées. En effet, l'excès de stress oxydatif dans ces normocytes déficients en G6PD est responsable de la formation d'hémichromes. Ces derniers se lient aux protéines bande 3 du normocyte et forment des clusters reconnus par le système immunitaire et le normocyte est phagocyté. L'augmentation de la phagocytose des normocytes infectés principalement par des anneaux (ceux-ci étant plus sensibles au stress oxydatif), confère une protection supplémentaire aux personnes déficientes en G6PD. Le dépôt d'hémichromes sur la membrane des normocytes est un phénomène naturel, lié normalement à la sénescence des normocytes (Bielitza et al., 2015b).

La déficience en *hGR* ou l'inhibition de la GR par un composé chimique protégerait du paludisme par l'induction de la phagocytose des érythrocytes infectés plus que par un réel impact sur la multiplication des parasites. Cela ouvre une nouvelle piste pour la synthèse d'antipaludiques innovants. Il est possible d'imiter l'effet de la déficience en G6PD par l'utilisation de molécules *redox cyclers* substrats de la GR, mais ces nouveaux composés ne doivent pas déclencher l'hémolyse des érythrocytes déficients en G6PD. Le bleu de méthylène, premier antipaludique synthétique est un exemple de *redox-cyclers*, ainsi que la 3-[4-(trifluorométhyl)benzyl]-menadione 1c maintenant appelée

Plasmodione (Ehrhardt et al., 2016; Müller et al., 2011). Cette molécule sera nommée bMD1c lors de cet exposé.

Actuels moyens de lutte contre le paludisme

Le diagnostique du paludisme

Si la goutte épaisse est encore la méthode standard utilisée pour les diagnostics rapides, elle requière une parasitémie seuil pour que le patient soit diagnostiqué positif (50 parasites/ μ L de sang).

De nouveaux tests basés sur la reconnaissance d'anticorps spécifiques capables de détecter *PfHRP2* ou de la lactate déshydrogénase parasitaire de façon espèce spécifique. Ces tests sont plus sensibles mais aussi plus chers, ce qui freinent leur utilisation massive et ne permettent pas de donner la parasitémie des patients (N J White et al., 2013). Une fois diagnostiqués positifs, les patients reçoivent un traitement médicamenteux adapté. Certaines personnes peuvent être porteuses du parasite (faibles stades asexués ou gamétocytes) mais asymptomatiques.

A la quête d'un vaccin efficace

Il n'existe toujours aucun vaccin contre le paludisme, même si plusieurs sont testés en phase clinique. Le challenge est de développer des vaccins qui interrompent la transmission du paludisme. Cela inclue les vaccins de type « classiques », qui ciblent les stades sexués du parasite chez l'Homme ou le moustique mais aussi des vaccins ciblant les stades pré-érythrocytaires et asexués (Group, 2011). À ce jour, le meilleur candidat est le RTS,S (Mosquirix, GSK) qui cible les protéines des circumsporozoïtes (CSP) sécrétées par les sporozoïtes de *Plasmodium falciparum*. La protection conférée par ce vaccin est qualifiée de modeste suite aux résultats de la phase III des essais cliniques réalisés sur des enfants de 6 à 12 semaines. Dans l'année suivant la vaccination, seulement 30% des enfants n'ont pas montré des symptômes cliniques et 26% n'ont pas développé une forme sévère du paludisme. Les résultats pour les enfants plus âgés de 5 à 17 mois sont plus encourageants avec 55% des enfants qui n'ont pas contracté la maladie et 35% n'ont pas développé une forme sévère (N J White et al., 2013) (RTSS Clinical Trials Partnership, 2015). Face à ces résultats très modérés, même vacciné, il est préconisé d'utiliser d'autres moyens

de protection tels que les moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée et les médicaments antipaludiques.

Contrôle des populations de moustiques vecteurs

Le contrôle des populations de moustiques dans les zones endémiques est le moyen le plus efficace pour réduire le paludisme utilisé à ce jour. Les méthodes les plus anciennes sont l'utilisation d'insecticides dans les champs et dans les habitations. Les aspersions intra-domiciliaires d'insecticide à pour but de tuer les femelles se reposant après s'être gorgées dans la nuit. Une large gamme d'insecticides peut être utilisés, mais le DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane) reste largement utilisé. Ce type d'épandage s'est montré jusqu'alors efficace. L'élimination des eaux stagnantes fait également parti des moyens les plus efficaces de réduire les populations de moustiques.

De nouvelles méthodes de contrôle des populations excitent aujourd'hui impliquant les nouvelles technologies. Au Brésil, la compagnie Oxitec tente de réduire les populations de moustiques en relâchant des moustiques mâles génétiquement modifiés dont la progéniture n'est pas viable (Winskill, Carvalho, Capurro, & Alphey, 2015). Une autre méthode est d'infecter les femelles moustiques avec la bactérie wolbachia, transmise à la progéniture par la mère et capable de réduire l'infection à Plasmodium entre 40 et 70% (Jeffery et al., 2009). Cependant, les conséquences d'une utilisation massive de ces méthodes soulèvent la question de la propagation des transgènes ou des bactéries à d'autres espèces non ciblées et donc perturber l'écosystème dans son ensemble.

Un des moyens les plus simples de protéger les populations est la distribution massive de moustiquaires imprégnées d'insecticide pyréthrianoïde. Ce système a déjà permis de réduire la mortalité de près de 20% chez les enfants de moins de 5 ans (World Health Organization, 2015).

Cependant, l'utilisation massive des pyréthrianoïdes comme insecticide en agriculture, à l'intérieure des habitations et pour les moustiquaires a eu pour conséquence la sélection de moustiques résistants. La propagation de la résistance aux insecticides est très préoccupante. Notamment la résistance aux pyréthrianoïdes utilisés pour les moustiquaires (Godfray, 2013).

Chémoprophylaxie

Les antipaludiques ayant une activité pré-érythrocytique (sur les stades hépatiques) sont recommandés comme traitements préventifs pour les voyageurs dans les zones endémiques toute la durée du séjour et pour les quatre semaines qui suivent. La prise de traitements préventifs ne permet pas une protection complète. Toute personne présentant un des symptômes pouvant être attribués au paludisme et revenant d'une région endémique doit se faire diagnostiquer.

Les traitements préventifs pour les populations étaient longtemps recommandés pour les femmes enceintes. Mais le développement de résistance du parasite face aux traitements utilisés a poussé à une utilisation des antipaludéens par intermittence dans le cas des femmes enceintes.

L'utilisation d'antipaludéens et leur mode d'action sera décrite plus en détail dans la partie 3 de cette introduction.

Cycle de vie du *Plasmodium*

Cycle de vie du parasite

Dans l'hôte vertébré

Le paludisme est provoqué par un protozoaire unicellulaire du genre *Plasmodium*, appartenant au phylum Apicomplexa (Cavalier-Smith, 1993). Cinq espèces de *Plasmodium* sont capables d'infester l'Homme.

Plasmodium falciparum est le plus virulent. Il est responsable de la majorité des cas mortels et peut rester séquestré dans des organes tels que le cerveau. *Plasmodium vivax* est peu mortel mais entraîne de lourdes séquelles. Il est répandu dans les zones tropicales hors d'Afrique. *P. vivax* et *P. ovale* sont capables de rester quiescents pendant des mois sous forme d'hypnozoïtes dans le foie, compliquant l'éradication. *Plasmodium malariae* ne forme pas d'hypnozoïtes mais peut subsister pendant des décennies sous forme d'infection sanguine asymptomatique. *Plasmodium knowlesi*, initialement décrit comme parasite des macaques à longue queue, peut également infecter l'Homme dans certaines régions telles que la Malaisie. (Greenwood et al., 2008)

Le cycle de vie du parasite nécessite une réplication asexuée au sein d'un hôte vertébré et une étape de reproduction sexuée dans un hôte invertébré, une femelle moustique anophèle qui lui servira de vecteur jusqu'à l'hôte vertébré suivant. Le cycle de vie de *P. falciparum* est décrit ici (figure 2).

de la cellule hôte. Le parasite évolue vers sa forme anneau et modifie le globule rouge à ses besoins. Durant le cycle intra-érythrocytaire, le parasite consomme le contenu du normocyte, change sa membrane pour ses propres importations de nutriments (insertion de transporteurs, antigènes, ...) et cristallise les déchets de la digestion de l'hème en hemozoïne inerte (N J White et al., 2013).

Depuis le stade anneau, le parasite devient trophozoïte, puis schizonte. À ce nouveau stade de schizogonie, le parasite se réplique par mitose au sein du normocyte. Il produit un nouveau lot de mérozoïtes. Lorsque le normocyte infecté éclate, les mérozoïtes sont relâchés dans la circulation et un nouveau cycle intra-érythrocytaire commence. Chaque cycle asexué produit 8 à 20 nouveaux mérozoïtes toutes les 48h. La population de parasite peut se multiplier entre 6 à 20 par cycle (Greenwood et al., 2008).

En fonction des facteurs environnementaux, certains anneaux se différencient en gamétocytes mâles ou femelles, plutôt qu'en trophozoïte. Les stades sexués ne sont pas pathogéniques pour l'homme, mais sont infectieux pour le vecteur anophèle. Lorsque les gamétocytes matures sont ingérés lors du repas sanguin, ils subissent un changement abrupt d'environnement qui enclenche leur sortie de l'érythrocyte. Les gamétocytes mâles se transforment en 8 microgamètes motiles après 3 cycles de réplication rapide de leur génome, suivit d'une division nucléaire ; les femelles émergent des érythrocytes en macrogamète de forme ronde. Le zygote qui résulte de la fécondation des gamètes, est le seul parasite capable de survivre dans un environnement aussi agressif qu'est l'intestin du moustique (Alano, 2007; Janse, van der Klooster, van der Kaay, van der Ploeg, & Prosper Overdulve, 1986). La différenciation en parasite sexué, est la seule voie de transmission pour *Plasmodium* afin de passer de l'hôte vertébré à l'insecte vecteur. La production de gamétocytes est une réponse à des conditions défavorables à la multiplication asexuée. L'exposition à un antipaludique peut être une de ces causes (Talman, Domarle, McKenzie, Arie, & Robert, 2004). L'engagement sur la voie sexuée de la gamétocytogénèse se fait au stade intra-érythrocytaire schizonte pour *P. falciparum* (Janse and Waters, 2004) dont les mérozoïtes produits ne continuent pas le cycle intra-érythrocytaire mais s'engagent sur la voie sexuée (Bruce, Alano, Duthie, & Carter, 1990). La morphologie spécifique des mâles et des femelles gamétocytes apparaît

seulement après 22h de maturation chez *P. berghei* (dont la maturation complète dure 26h) (Janse and Waters, 2004) et après 6 à 10 jours de maturation chez *P. falciparum*. (Alano and Billker, 2005). Le sexe du gamétocyte semblerait prédéterminé dès son engagement dans la voie, si les différences morphologiques apparaissent bien plus tard, les deux gamétocytes sont moléculairement différents (Alano, 2007). Les premières 48h du développement des gamétocytes *P. falciparum*, sont similaires au trophozoïte sur le plan métabolique, de la cytoadhérence, du transcriptome et de la sensibilité aux antipaludéens comme la sulphadoxine et la chloroquine. Plus tard dans la maturation, les gamétocytes deviennent plus résistants, voire insensibles à ces composés (Alano, 2007). Seuls les gamétocytes matures sont relâchés dans la circulation sanguine. Les jeunes gamétocytes sont séquestrés dans la moelle épinière dans un premier temps puis dans la rate de la personne infectée (Smalley, Abdalla, & Brown, 1981). La séquestration est aussi observée pour les stades asexués : seuls les anneaux sont présents dans la circulation sanguine alors que les trophozoïdes et schizontes sont séquestrés dans les organes (mais non spécifiquement contrairement aux gamétocytes) par cytoadhérence. Les mécanismes de séquestration/relargage spécifique des gamétocytes dans la moelle épinière restent encore inconnus (Alano, 2007).

Pour être mature, les gamétocytes de *P. falciparum* doivent passer par 5 stades dissociables par leur morphologie (Adjalley et al., 2011). La demi-vie d'un gamétocyte mature (stade V) de *P. falciparum* varie entre 2.4 à 6.4 jours selon les études (Talman et al., 2004).

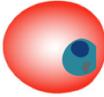
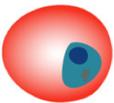
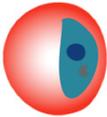
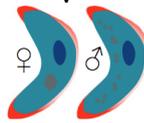
	Stage I	Stage II	Stage III	Stage IV	Stage V
Morphologie	<p>Très similaire au trophozoïte. Plus grands et ronds, pigments granulaires</p> <p>I</p>  <p>I-II</p> 	<p>Allongé dans le normocyte. Possède une forme en « D »</p> <p>II</p> 	<p>La forme en « D » est un peu déformée. Distinction mâle/femelle (coloration rose/bleu)</p> <p>III</p> 	<p>Élongation dans le normocyte qui se déforme. Mâle : pigments regroupés. Femelle : pigments plus denses</p> <p>IV</p> 	<p>Forme de « saucisse » avec des extrémités rondes. Mâle : pigments regroupés et coloration rose. Femelle : pigments plus denses coloration violette</p> <p>V</p> 
Temps d'apparition (jours)	0 - 2	1 - 4	2 - 8	6 - 10	9 - 23
Stade du cycle cellulaire	G1	G1	G0	G0	G0

Figure 3 : Morphologie des différents stades de la gamétocytogénèse chez *P. falciparum* (Adjalley et al., 2011; Talman et al., 2004)

La durée de la gamétocytogénèse est très différente d'une espèce à l'autre, 24-26h pour *P. berghei* ou *P. yoelii*, 21 jours sont nécessaires pour la maturation des gamétocytes *P. falciparum*. L'émergence des gamètes, le phénomène d'exflagellation et la formation d'oocynète sont des événements très conservés au sein de toutes les espèces de *Plasmodia*.

Dans l'hôte vecteur invertébré

L'infection de la femelle moustique a lieu lorsque celle-ci prend un repas sanguin sur un individu infecté. Elle ingère des gamétocytes sexuellement différenciés (macrogametocyte femelle et microgametocyte mâle) et dans les 15 minutes suivantes, l'environnement particulier de l'intestin enclenche l'émergence des gamétocytes et leur différenciation en macro- et microgamètes. Cette émergence des gamétocytes mâles est appelée exflagellation car ceux-ci sont mobiles à l'instar des femelles (M. J. Delves et al., 2013). La fertilisation, suivi de la fusion des gamètes amène à la formation du zygote, cellule diploïde. Celui-ci subit une

division méiotique pour devenir un oocinète motile. L'oocinète traverse la membrane péritrophique, formée lors du repas sanguin et l'épithélium de l'intestin, pouvant mener à l'apoptose des cellules envahies. Les parasites ayant pu passés du coté basal de l'épithélium, se développent en oocyste et terminent une phase critique de leur cycle. Après plusieurs divisions mitotiques, le dernier stade sexué, les sporozoites, sont formés. Ils sortent de l'oocyste mature et migrent dans l'hémolymphe du moustique jusqu'aux glandes salivaires. Les sporozoites sont transmis lors d'un repas sanguin, lorsque la femelle injecte sa salive pour chercher les vaisseaux sanguins. Seul un petit nombre de sporozoites sont injectés dans la peau où ils tentent de gagner les hépatocytes, bouclant le cycle.

Plusieurs différences peuvent être soulignées entre les stades parasitaires chez l'Homme et ceux chez le moustique :

- Dans le moustique, les stades sont principalement extracellulaires
- Le nombre de parasites dans le moustique est bien inférieur à celui chez l'Homme
- La morphologie et le protéome diffèrent beaucoup d'un stade à l'autre. Les seuls stades communs aux deux hôtes sont les gamétocytes et les sporozoites
- Le fitness des deux hôtes, Homme et moustique est affecté par une infection par le parasite

(Gonçalves & Hunziker, 2016).

Durant son cycle complet, ce parasite unicellulaire utilise plus de 5 000 gènes pour réaliser des métamorphoses et se développer dans des organismes aussi différents que l'Homme et le moustique pour compléter son cycle de vie. Il peut devenir mobile, réaliser des cycles, être invasif ou dormant, intracellulaire ou extracellulaire, asexué, mâle ou femelle (Greenwood et al., 2008).

Le vecteur du parasite : les moustiques Anopheles

Les moustiques sont des diptères appartenant à la famille des *Culicidae*. Cette famille est divisée en 3 sous-familles : les *Culicinae*, les *Toxorhynchitinae* et les *Anophelinae* (B.J. Beaty et W.C. Marquardt, 1996). Les *Anophelinae* comprennent le genre *Anopheles*, responsable de la transmission du paludisme à l'Homme.

Anopheles gambiae, *Anopheles coluzzii* et *Anopheles funestus* sont les trois principaux vecteurs du paludisme en Afrique (Godfray, 2013). *A. gambiae* est anthropophile et vit près des habitations humaines. Ses sites de ponte typiques sont de petites étendues d'eau temporaires exposées à la lumière du soleil, telles que les flaques d'eau produites par la pluie. Les nombres de sites de ponte augmentant à la saison des pluies, l'abondance de moustiques augmente également. Durant la saison sèche, certaines espèces, notamment *A. coluzzii*, pondent dans des eaux stagnantes laissées par l'activité humaine (traces de roues ou de pas) alors que d'autres espèces restent cachés dans des lieux humides.

Les œufs sont pondus directement à la surface et éclosent 48h après la ponte. Le développement des larves est rapide et s'effectue en moins d'une semaine si les températures sont chaudes et la nourriture abondante. Les larves filtrent la surface de l'eau pour se nourrir d'algues et de microorganismes. La larve se métamorphose en puppe durant 1 à 3 jours en fonction de la température. Les adultes venant d'émerger ont besoin d'au moins 24h avant d'être sexuellement matures. Suite à l'accouplement, la femelle se met en quête d'un repas sanguin après le couché du soleil. Seule la femelle est hématophage, le mâle se nourrit de nectar de fleur. La femelle *Anopheles* est attirée par les habitations humaines où elle se nourrit et se repose après s'être gorgée sur un hôte vertébré. Ce repas sanguin est nécessaire au développement des œufs. Quarante-huit heures après le repas sanguin, de nouveaux œufs sont prêts à être pondus (B.J. Beaty et W.C. Marquardt, 1996).

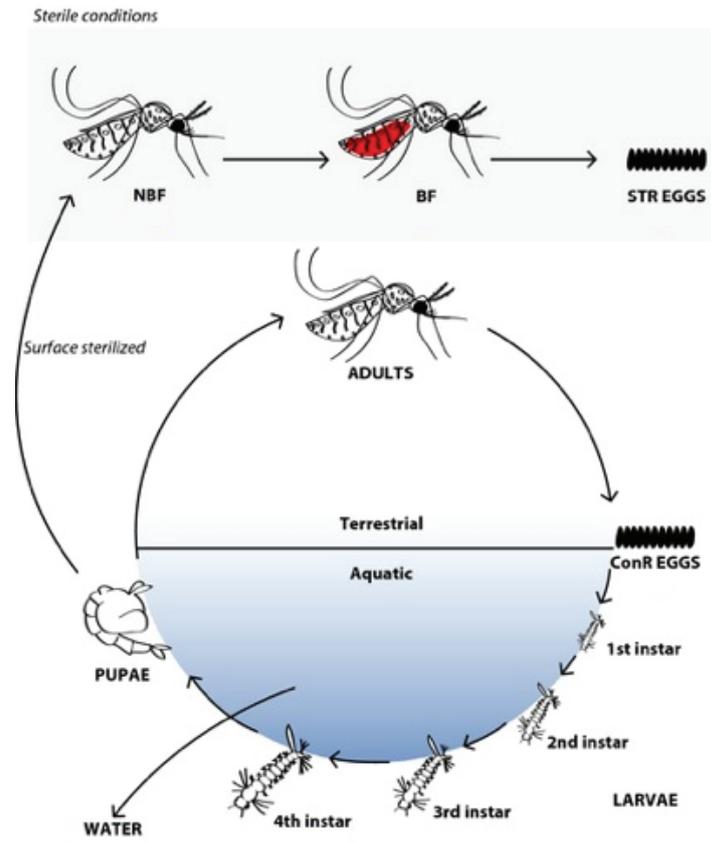


Figure 4 : Cycle de vie du moustique *Anopheles* (Coon, Vogel, Brown, & Strand, 2015)

Les traitements antipaludiques

Situation et besoins actuels

Le panel des antipaludéens étant large, je me concentrerai sur la présentation du bleu de méthylène, de la chloroquine, de l'atovaquone et de l'artémisinine. Pour un panel descriptif plus large des antipaludéens existants, un tableau récapitulatif est situé en annexe (tableaux 1 à 4).

Historiquement, le bleu de méthylène fût le premier composé synthétique utilisé par Paul Ehrlich en 1891 pour soigner le paludisme. Son utilisation fût abandonnée pendant la guerre du Pacifique pour ses effets secondaires très visibles (coloration de l'urine et de la scléra des yeux en bleu) et aux profits de composés plus rapides tels que la chloroquine. Son mode d'action n'est pas encore complètement élucidé mais il interfère avec la cristallisation de l'hème car après réduction par la GR sa forme réduite, le leuco-bleu de méthylène, transfère ses électrons aux formes ferriques (Fe^{2+}) de l'hème et de l'hémoglobine. C'est aussi un inhibiteur non compétitif et un substrat de la glutathion réductase du parasite (*PfGR*), déplaçant le parasite de son glutathion (GSH), un antioxydant essentiel à la cellule. Si le MB a été abandonnée pendant longtemps, il est reconsidéré dans les récents essais cliniques pour (i) sa capacité à bloquer la transmission par son effet gamétocytocidal, (ii) l'absence de résistance chez le parasite pour ce composé et (iii) l'absence d'hémolyse aux médicaments thérapeutiques chez les patients déficients en enzyme G6PD et (iv) son coût très peu élevé (Adjalley et al., 2011; Coulibaly et al., 2009; Meissner et al., 2005; Schirmer et al., 2003).

Un composé bien plus rapide que le bleu de méthylène et ne nécessitant qu'une prise, la chloroquine a été découvert en 1934. Traitement simple et efficace, la chloroquine est bien tolérée en général par prise orale. Grâce à ses propriétés lysosomotropiques, la chloroquine se concentre dans la vacuole digestive à pH acide, entraînant une inhibition de la cristallisation de l'hémozoïne, laissant

l'hème lipophile et toxique endommager les membranes du parasite et de la cellule hôte. Elle est utilisée contre toutes les espèces de *Plasmodium* dans les cas non sévères mais ne constitue plus les premières lignes de traitement. En effet, la résistance à la chloroquine s'est répandue en Asie du Sud-Est et en Afrique et son application entraîne une augmentation de la production de gamétocytes chez les patients (Mehlhorn et al. 2001 ; Delves et al., 2012).

L'atovaquone, antipaludique développé pendant la seconde guerre mondiale, est utilisé en combinaison avec le proguanil (Malarone) pour le traitement des cas de paludisme non sévère chez l'enfant et l'adulte. Il est aussi recommandé comme traitement prophylactique chez les voyageurs en régions endémiques. L'atovaquone est un inhibiteur compétitif de l'ubiquinol, spécifique au complexe bc1 de la chaîne de transport d'électron de la mitochondrie. L'inhibition du complexe bc1 résulte en la perte de la fonction respiratoire de la mitochondrie (inhibition de la synthèse de pyrimidine et purine dans les stades asexués). L'atovaquone est un composé à l'action lente comparé à la CQ ou à l'ART et peut engendrer de la résistance très facilement chez le parasite s'il est pris en monothérapie (Butcher & Sinden, 2003; Nixon et al., 2013).

La découverte de l'artémisinine ou quinghaosu en chinois, marque un tournant dans la lutte contre le paludisme. Ce traitement extrait de *Artemisia annua* et mis au point par Youyou Tu est extrêmement actif contre les souches résistantes *in vitro* et *in vivo*, montre une clairance des parasites et une diminution de la fièvre plus rapides que n'importe quel autre antipaludique. Les résistances développées contre la chloroquine et la sulphadoxine-pyriméthamine, ont amené à adopter le traitement à l'artémisinine comme première ligne de traitement. Les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (ACTs) et d'un autre antipaludique de classe chimique différente à l'action plus longue sont les traitements les plus utilisés de nos jours. Ces combinaisons sont composées (i) d'un dérivé de l'artémisinine tel que l'artémether, l'artesunate ou la dihydroartémisinine qui possèdent une plus grande biodisponibilité que l'artémisinine et (ii) d'un antipaludique à demi-vie longue (les plus utilisés sont la méfloquine, la luméfantrine, l'amodiaquine, la piperaquine et la pyronaridine). Cette méthode augmente l'efficacité du traitement et réduit la pression sélective

sur une souche résistance pour un antipaludéen particulier et donc réduit l'émergence de souches résistantes. Le mode d'action est encore mal connu, mais la majorité des études s'accordent sur l'action de l'artémisinine sur l'hème, produisant des espèces radicales dans la vacuole digestive du parasite pendant la digestion de l'hémoglobine. Une réduction de l'efficacité de l'artémisinine contre *P. falciparum* a déjà été reporté en Thaïlande et au Cambodge. Cette région étant le berceau de la résistance à la chloroquine et au sulphadoxine-pyriméthamine, le risque de propagation de la résistance à l'artémisinine est préoccupant (Eastman R.T. and Fidock D.A., 2009).

Actuellement les seuls antipaludéens capables de réduire la gamétocytemie des patients sont le bleu de méthylène, la primaquine et l'artémisinine (M. Delves et al., 2012). La grande majorité des antipaludiques disponibles aujourd'hui ont été créés dans le but de cibler les stades intra-érythrocytaires, responsables des symptômes cliniques. Pour atteindre l'éradication, les nouveaux antipaludiques doivent posséder certaines caractéristiques précises décrites par MMV :

- (i) Avoir une efficacité et une vitesse d'action aussi importante que l'artémisinine et ciblant les jeunes stades anneaux
- (ii) Avoir une bonne biodisponibilité orale
- (iii) Réduire, voire stopper la transmission d'un patient à l'autre
- (iv) Être actifs sur les 5 espèces de parasites humains sans résistance croisée
- (v) Avoir un faible risque de sélectionner des parasites résistants
- (vi) L'élimination complète des hypnozoïtes hépatiques
- (vii) Être un traitement prophylactique empêchant une nouvelle infection de s'établir
- (viii) Être un traitement prophylactique pour des personnes vulnérables (jeunes enfants et femmes enceintes)
- (ix) Être sans danger pour les personnes vulnérables (jeunes enfants, femmes enceintes, personnes déficientes pour la G6PDH, infectées par le VIH ou la tuberculose, mal nourrit, ...)

- (x) Être aussi peu cher que la chloroquine, idéal un traitement devrait coûter 1\$ (Burrows, Hooft van Huijsduijnen, Möhrle, Oeuvray, & Wells, 2013; Delves et al., 2012).

Actuellement, MMV regroupe un portfolio de molécules prometteuses plus moins avancées dans les pipelines d'antipaludiques. Citons quelques exemples : (i) l'artefenomel est la combinaison du OZ438 et de la ferroquine et est actuellement en phase IIb des essais cliniques. OZ438 est un composé à l'action rapide, actifs sur les souches de parasites résistants à l'artémisinine et bloquant la transmission. La ferroquine est un antipaludique actif pendant une longue durée, contre des souches de parasites résistants à la chloroquine, à la mefloquine et à la piperaquine. (ii) Le KAF156 possède un mode d'action complètement novateur et est en phase IIa des essais cliniques. C'est un composé à l'action rapide, capable de réduire la transmission et possède un potentiel prophylatique. Enfin, (iii) l'AN13762 est un composé en étude préclinique, présentant un profile de toxicité sûr, une clearance des parasites rapide, un potentiel prophylaxique ainsi qu'une réduction de la transmission (www.mmv.org).

Un parasite résistant à presque tous les antipaludiques actuels

La résistance se définit comme une réponse concentration-effet plus lente. Le principal effet des antipaludiques est d'inhiber la multiplication des parasites. Ainsi *Plasmodium* devient résistant à un antipaludique lorsque le temps de clairance du parasite augmente.

La probabilité qu'un parasite résistant se développe dépend de plusieurs facteurs :

- le nombre de parasites exposés à l'antipaludique
- la concentration de cet antipaludique à laquelle le parasite est exposé
- la pharmacocinétique et la pharmacodynamique de l'antipaludique
- les changements génétiques dans le génome du parasite
- l'immunité de l'hôte

- la présence simultanée d'un autre antipaludique actif sur le parasite

Les changements dans le génome du parasite entraînant une résistance sont très rares. Ils peuvent être un changement du nombre de copies de la cible de l'antipaludique ou d'un canal permettant de réduire la concentration des xénobiotiques dans le parasite (N J White & Pongtavornpinyo, 2003).

La résistance à la chloroquine est apparue dans les années 1970 et s'est propagée en Afrique dans les années 1980s. La résistance à la chloroquine entraîna une forte augmentation de la mortalité, des anémies sévères, des naissances d'enfants à très faible poids et d'une augmentation de la transmission (World Health Organization, 2015). Les antipaludiques entraînant le plus de phénomènes de résistance chez les patients sont la pyriméthamine et l'atovaquone (N J White & Pongtavornpinyo, 2003). C'est en Asie du Sud-Est que *P. falciparum* a le plus de propension à devenir résistant à un antipaludique (N J White & Pongtavornpinyo, 2003). La résistance de *P. falciparum* à l'artémisinine a déjà été détectée dans 5 pays d'Asie du Sud-Est (Cambodge, Laos, Myanmar, Thaïlande et Vietnam. Le ralentissement de la clairance des parasites dans les patients traités aux ACTs montre que l'artémisinine a perdu son efficacité mais pas l'antipaludique partenaire. Cette situation risque de favoriser le développement de résistance aux partenaires en plus de la résistance à l'artémisinine, ce qui serait un échec des ACTs (World Health Organization, 2015).

P. falciparum a développé des résistances contre tous les antipaludéens utilisés à part le bleu de méthylène. La propagation de parasites résistants augmente considérablement les coûts économiques de contrôle du paludisme et pousse la communauté scientifique à développer continuellement de nouveaux antipaludiques afin de remplacer ceux devenus inactifs.

Stress oxydatif et maintenance de l'homéostasie redox chez le parasite

Digestion de l'hémoglobine de la cellule hôte

Au stade asexué, *P. falciparum* puise les nutriments qui lui sont nécessaires en digérant l'hémoglobine du normocyte hôte. L'oxydation de l'hémoglobine ($\text{Hb}(\text{Fe}^{2+})$) puis la digestion en méthémoglobine ($\text{metHb}(\text{Fe}^{3+})$) au sein de la vacuole digestive génère des ferriprotoporphyrines ($\text{FPIX}(\text{Fe}^{3+})$ ou $\text{FPIX-OH}(\text{Fe}^{3+})$ ou hème) qui sont toxiques pour le parasite. Pour se défendre de ce stress oxydatif, le parasite possède deux métabolismes au thiol (détaillés dans la section suivante) et un processus de biocristallisation de l'hémozoïne. En effet au pH acide de la vacuole digestive, le $\text{FPIX}(\text{Fe}^{3+})$ peut cristalliser dans la vacuole digestive du parasite pour former un cristal insoluble appelé hémozoïne. Par ailleurs, le pH acide (5.2) de la vacuole digestive favorise l'auto-oxydation de $\text{Hb}(\text{Fe}^{2+})$ en $\text{FPIX}(\text{Fe}^{3+})$. Cette réaction libère un électron qui en présence d'oxygène, forme un ion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$) qui dismute spontanément en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) au pH acide de la vacuole. En présence d'espèce ferrique (Fe^{2+}), le peroxyde d'hydrogène s'oxyde et forme un radical hydroxyle ($\text{OH}\cdot$) (réaction de Fenton). Le radical hydroxyle est un oxydant très puissant qui dégrade l'hème de l'hémoglobine.

Par ailleurs, le $\text{FPIX}(\text{Fe}^{3+})$, possède une conformation différente du $\text{FPIX}(\text{Fe}^{2+})$ digérable par les protéases de la vacuole digestive parasitaire. Les acides aminés libérés sont utilisés pour le développement du parasite et l'hème libre est spontanément cristallisé en dimère à pH acide (pH 5.2).

Des antipaludiques, tels que la chloroquine et ses analogues 4-aminoquinolines, inhibent la formation de l'hémozoïne en se liant à l'hème avant qu'il ne soit cristallisé. La chloroquine empêche la détoxification de l'hème, engendrant des espèces réactive de l'oxygène et détériorant les protéines et les membranes du parasite, entraînant sa mort.

Le parasite digère préférentiellement la forme méthémoglobine(Fe^{3+}) (metHb). Le bleu de méthylène est connu pour réduire la méthéobglobinémie car le leuco-bleu de méthylène réduit la metHb(Fe^{3+}) en Hb(Fe^{2+}). Si la concentration de metHb est réduite, le parasite digère moins vite l'Hb de l'hôte en présence de bleu de méthylène, récupère moins d'acides aminés et sa croissance est ralentie. De plus, la conversion continue de FPIX(Fe^{3+}) et FPIX(Fe^{2+}) inhibe la cristallisation de l'hème. Par conséquent, les composés redox capables de réduire les ions FPIX(Fe^{3+}) en FPIX(Fe^{2+}), empêchent la formation de l'hémozoïne et augmente le stress oxydatif dans le parasite (Müller et al., 2011).

Maintien de l'homéostasie redox du parasite

Tout le long de son cycle, le parasite est exposé à un stress oxydatif très élevé. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) peuvent être le produit de métabolismes internes, comme la digestion de l'hémoglobine du normocyte, ou de réponses externes, comme la défense immunitaire chez le moustique. Pour gérer ces espèces réactives et maintenir l'homéostasie, le parasite possède un système redox principalement basé sur les métabolismes du glutathion et de la thiorédoxine (Jortzik & Becker, 2012b). L'équilibre redox du parasite dépend principalement du glutathion (γ -L-glutamyl-L-cystéinyl-glycine) pour maintenir son environnement réducteur dans le cytosol. Le glutathion est impliqué dans la détoxification des xénobiotiques (antipaludiques), des ROS et des produits métaboliques (digestion de l'hème). Pour ce faire, le glutathion doit être maintenu sous sa forme réduite (GSH) et à plus haute concentration que sa forme oxydée, le disulfure de glutathion (GSSG), soit un ratio GSH:GSSG élevé. La production de GSH se fait par synthèse *de novo* ou par recyclage de la forme oxydée. La synthèse *de novo* est assurée par deux enzymes : la γ -glutamyl-cysteine synthétase (γ GCS) et la glutathione synthétase (GS). Ces deux enzymes sont essentielles chez *P. falciparum* mais pas chez *P. berghei* (Jortzik & Becker, 2012b; Pastrana-Mena et al., 2010; Patzewitz, Wong, & Müller, 2012). La forme oxydée est recyclée par la glutathion réductase (GR), une flavoenzyme NADPH-dépendante, par réduction du GSSG avec les cofacteurs FAD (Flavine adénine dinucléotide) et NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate). La GR

est essentielle à *P. falciparum* et est considérée comme une cible thérapeutique pour de nouveaux antipaludiques. Contrairement à d'autres espèces de *Plasmodium*, l'import de GSH de la cellule hôte ne se fait pas chez *P. falciparum* (Patzewitz et al., 2012). Cela souligne l'intérêt de ce métabolisme comme cible thérapeutique.

Le métabolisme de la thiorédoxine comprend des messagers cellulaires mais aussi des mécanismes de défense contre le stress oxydatif. Le parasite possède plusieurs enzymes dont deux thiorédoxine-like protéines (Tlp1-2), une thiorédoxine réductase (TrxR), trois thiorédoxines classiques (Trx1-3), une plasmorédoxine dédiées au métabolisme de la thiorédoxine. La thiorédoxine est réduite par la TrxR, par échange d'électrons impliquant les cofacteurs NADPH et FAD. Comme la PfGR, la PfTrxR est une bonne cible thérapeutique. Cette enzyme est essentielle chez *P. falciparum* mais pas chez *P. berghei*. La TrxR réduit la thiorédoxine oxydée (Trx(S₂)) en thiorédoxine réduite (Trx(SH)₂). S'ensuit une réaction non enzymatique entre la (Trx(SH)₂) et le GSSG qui réduit le GSSG en deux molécule de GSH, formant une sorte de sécurité du système oxydatif (Jortzik & Becker, 2012b).

Le fonctionnement de ces deux systèmes de régulation de l'équilibre redox repose sur deux flavoenzymes dépendantes du NADPH. Le NADPH est un agent réducteur essentiel, principalement généré par une enzyme de la voie des pentoses phosphate, la glucose-6-phosphate déshydrogénase-6-phosphogluconolactonase, ou GluPho, dans le parasite au stade asexué. Cette enzyme bi-fonctionnelle regroupe la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) et la 6-phosphogluconolactonase (6PGL) et est essentielle pour *P. falciparum*. L'absence d'homologies entre la PfGluPho et les G6PDH et 6PGL humaines, font de la GluPho une cible thérapeutique de choix pour de nouveaux antipaludiques. Dans la voie des pentoses phosphates, le NADPH est produit lors de la transformation du glucose-6-phosphate en 6-phosphoglucono- δ -lactone puis lors de la transformation du 6-phosphogluconate en ribulose-5-phosphate (Preuss, Jortzik, & Becker, 2012).

Si le métabolisme des stades asexués a été plutôt bien caractérisé, le métabolisme des gamétocytes est encore très mal connu. Les gamétocytes sont capables de passer d'un environnement riche, le sang, à un environnement hostile, l'intestin de moustique, avec des changements de température et de pH importants. C'est précisément lors de ce changement, que les gamétocytes sont supposés subir des changements métaboliques considérables. Les jeunes gamétocytes possèdent un métabolisme de digestion de l'hémoglobine similaire aux stades asexués. Ce métabolisme est abandonné au cours de la maturation, dès les stades III et IV. La majorité des antipaludiques visent des cellules au métabolisme actif, tels que les trophozoïtes en pleine multiplication et produisant des dizaines de mérozoïtes en deux jours. Or les gamétocytes sont des cellules actives, elles ne sont pas quiescentes, mais elles ne se multiplient pas. Par ailleurs la maturation des gamétocytes a lieu dans la moelle osseuse et seuls les gamétocytes matures sont relâchés dans la circulation sanguine. Ce système de séquestration pourrait garder les gamétocytes protégés des antipaludiques. La raison de leur résistance aux antipaludiques lors de la maturation est également inconnue (Talman et al., 2004).

Chez *P. berghei* l'inactivation de gène par recombinaison homologue est facilement réalisable comparé à *P. falciparum*. Ainsi l'inactivation des gènes impliqués dans le métabolisme du GSH, recyclage (GR^{-/-}) et synthèse *de novo* (γ GCS^{-/-}) a montré que ces enzymes ne sont pas essentielles pour les stades sanguins de *P. berghei* contrairement à *P. falciparum*. Si ces mutants *P. berghei* invalidés parviennent à se développer normalement aux stades asexués malgré l'absence de ces enzymes, cela est sans doute dû au fait que *P. berghei* est capable d'importer le GSH de la cellule hôte par un mécanisme encore inconnu (Patzewitz et al., 2012). De plus, *P. berghei* envahit préférentiellement les réticulocytes (Janse et al., 1989). Au contraire des normocytes matures, les réticulocytes contiennent encore une γ GCS fonctionnelle. Cela permet à *P. berghei* d'avoir un système d'apport de GSH de la cellule hôte sécurisé durant le

développement asexué (Patzewitz et al., 2012).

En revanche, les parasites ($GR^{-/-}$) et ($\gamma GCS^{-/-}$) ne sont pas viables pour les stades chez le moustique. Par ailleurs, si l'une ou l'autre voie peut être invalidée séparément, l'invalidation des deux voies en même temps n'est pas viable (Pastrana-Mena et al., 2010).

Ces résultats démontrent l'importance de la régulation du stress oxydatif pour le parasite.

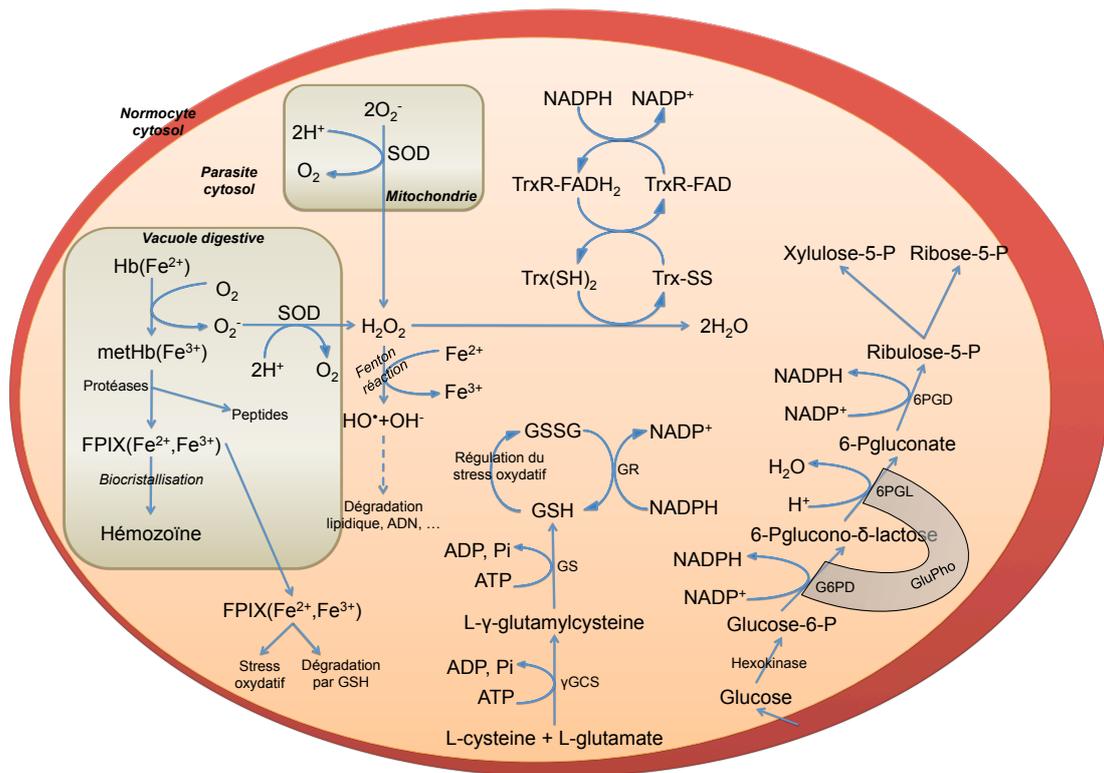


Figure 5 : Système antioxydant du parasite *P. falciparum* asexué

bMDs : une nouvelle génération d'antipaludiques

L'inhibition de la GR comme cible

Les 3-[benzyl]-menadiones substitués (bMDs) sont proposés d'être bioactivés et leurs métabolites, les 3-[benzoyl]-menadiones substitués (benzoylMDs) se sont révélés être d'excellents inhibiteurs incompétitifs de la GR *in vitro* sur enzyme recombinante. Une PfGR recombinée est capable de réduire les benzoylMDs *in vitro* en présence de NADPH avec une grande affinité. La pharmacocinétique mesurée pour le composé leader sur la PfGR est la meilleure mesurée jusqu'à présent, plus efficace que la ménadione, utilisée comme contrôle et autant que le bleu de méthylène. La réduction de la methHb en Hb peut être mesurée *in vitro* par absorbance. En présence de GR et NADPH, les benzoylMDs réduisent la methHb par transfert d'électrons, tout comme le MB, contrôle positif, mais pas la chloroquine, contrôle négatif.

Les bMDs possèdent une très faible cytotoxicité contre les cellules humaines (IC₅₀ sur KB et MRC-5 au-dessus de 32 µM) et ne génèrent aucune hémolyse des érythrocytes infectés ou non, même à plusieurs dizaines de micromolaires (30µM) (Müller et al., 2011).

Les redox cyclers

Les *redox cyclers* agissent comme substrats subversifs sur les flavoenzymes NADPH-dépendantes. Un substrat subversif est un substrat qui rentre dans le cycle catalytique en se faisant réduire en présence de NADPH. Les substrats subversifs opèrent comme catalyseurs car en présence d'oxygène, la forme oxydée du *redox cycler* est régénérée en continue. Ce cycle d'oxydo-réduction conduit à un flux de ROS. En présence d'un cofacteur catalytique du *redox cycler*, l'enzyme qui devait fonctionner comme une réductase devient une enzyme pro-

oxydante (Ehrhardt et al., 2013b; Müller et al., 2011).

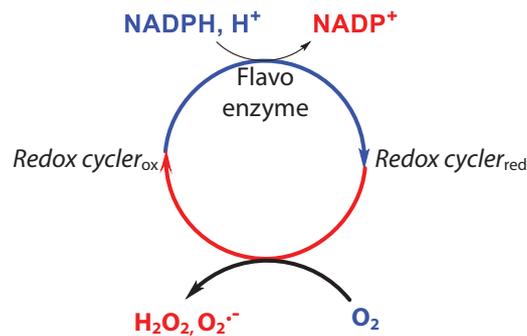


Figure 6 : Schéma de l'action des *redox cyclers* sur une flavoenzyme. Les *redox cyclers* ont trois effets physiologiques lorsqu'ils interagissent avec une flavoenzyme : (i) consommation et gaspillage du NADPH de la cellule ; (ii) inhibition de la réaction physiologique de la flavoenzyme et (iii) production de ROS et de forme *redox cyclers* réduite (*redox cyclers_{red}*) toxique.

Plusieurs types d'inhibiteurs (réversibles, irréversibles, incompétitifs ou substrat suicide) de la GR de la famille des bMDs ont été synthétisés. Leur effet sur le parasite a été mesuré et le type d'inhibiteur révélé le plus antipaludique appartient aux *redox cyclers* agissant comme substrat subversif de la GR (Müller et al., 2011).

Études du bMD1c in vitro et in vivo

L'activité du bMD1c a d'abord été testée sur les stades asexués sur deux souches de *P. falciparum* de laboratoire 3D7 (CQ^S) et Dd2 (CQ^R). Le bMD1c inhibe la multiplication des deux souches, résistante ou non à la chloroquine avec une concentration inhibitrice médiane (IC₅₀) de l'ordre du nanomolaire (46 nM to 60 nM respectivement). L'IC₅₀, ou concentration inhibitrice, est une mesure de l'efficacité du composé pour inhiber une fonction biologique ou biochimique spécifique. Cette mesure quantitative indique quelle quantité d'un composé est nécessaire pour inhiber à moitié un processus biologique donné.

Ensuite son activité a été mesurée sur des souches isolées d'Asie du Sud-Ouest (W2, K14, K2, Dd2), d'Afrique (FCM29, FCR3, PA, L1, Voll), d'Amérique du Sud (Bres). Ces souches sont résistantes à la pyriméthamine, à la quinine et/ou à la

mefloquine, à la monodesethylamodiaquine ou à la chloroquine. L'activité du bMD1c contre ces souches varie peu et les IC₅₀ mesurées sont similaires à celles mesurées sur les souches de laboratoire (de 41nM contre FCM29 à 215nM contre W2). Ces résultats mettent en évidence l'absence de résistance croisée de la bMD1c avec ces antipaludiques.

Le bMD1c est actif contre tous les stades intra-érythrocytaires avec une efficacité plus prononcée sur les stades anneaux. Alors que la grande majorité des antipaludiques agissent sur le métabolisme du trophozoïte, seuls l'artémisinine, le bleu de méthylène, les indolones-N-oxides et le bMD1c agissent sur les anneaux. Ils agissent tous sur le métabolisme redox du parasite, montrant la sensibilité particulière des anneaux au stress oxydatif.

La capacité d'un antipaludique à éliminer les parasites dépend beaucoup de sa vitesse d'action. Le bMD1c agit aussi rapidement que l'artémisinine (un des antipaludiques les plus rapides).

Plasmodium est capable de s'adapter et de développer des mécanismes de résistance contre tous les antipaludiques présents sur le marché. Certains antipaludiques sont plus prompts à induire ces résistances que d'autres. Identifier cette aptitude le plus tôt possible dans le processus de développement de médicament est essentiel. En exposant *P. falciparum* à des quantités sub-létales de bMD1c (5x ou 10x IC₅₀), tous les parasites ont été éliminés dans les 5 jours. De plus, après 12 semaines de culture aucun parasite résistant n'a été observé. En comparaison, des parasites résistants apparaissent après 5 semaines de culture sous du 5-fluoroorotate. Le bMD1c ne serait pas un composé induisant facilement un mécanisme de résistance chez les parasites.

Les nouvelles politiques de traitement du paludisme favorisent des bi- ou trithérapies au lieu de composé unique, afin d'empêcher l'émergence de parasites résistants. Les interactions du bMD1c avec d'autres antipaludiques de classe chimique différente ont donc été testées *in vitro*. Le bMD1c a une action synergique en combinaison avec la dihydroartémisinine sur des parasites résistants à la chloroquine (CQ^R ou CQ^S) (K1 et 3D7). La synergie est plus faible avec l'artémisinine. La combinaison avec la quinine est synergique uniquement

sur la souche CQ^S mais pas CQ^R. En revanche le bMD1c est un antagoniste de la chloroquine, de la fosmidomycine, de l'amodiaquine, du bleu de méthylène et de la ferroquine. Si la structure du bMD1c possède des similitudes avec celle de l'atovaquone, utilisés en combinaison les deux composés sont indifférents l'un de l'autre (Ehrhardt et al., 2016). Par ailleurs, le bMD1c et l'atovaquone exercent des modes d'action distincts (Ehrhardt et al., 2013).

L'activité *in vivo* du bMD1c contre *P. berghei* a été mesurée par un test de Peter sur 4 jours. Le composé a été administré par injection journalière (4h, 24h, 48h et 72h post passage) en intra-péritonéale à 30mg/kg. La baisse de la parasitémie mesurée est alors de 20.7-28.4%. En comparaison la chloroquine, injectée en i.p. à 10mg/kg, diminue de 94.9% la parasitémie. Cela suggère que le composé possède une faible biodisponibilité et doit être éliminé rapidement au cours du métabolisme de l'hôte (Müller et al., 2011).

Si l'on applique à bMD1c les différents critères de sélections de MMV pour les bons candidats médicaments décrits précédemment :

- (i) Avoir une efficacité et une vitesse d'action aussi importante que l'artémisinine et ciblant les jeunes stades anneaux : ✓
- (ii) Avoir une bonne biodisponibilité orale : ✗
- (iii) Réduire, voire stopper la transmission d'un patient à l'autre : **N.D.**
- (iv) Être actifs sur les 5 espèces de parasites humains sans résistance croisée : (✓) testé sur *P. falciparum* et *P. vivax*. Actif sur les souches *Pf* résistantes à pyriméthamine, à la quinine et/ou à la méfloquine, à la monodeséthylamodiaquine ou à la chloroquine.
- (v) Avoir un faible risque de sélectionner des parasites résistants : ✓
- (vi) L'élimination complète des hypnozoïtes hépatiques : **N.D.**
- (vii) Être un traitement prophylactique empêchant une nouvelle infection de s'établir : **N.D.**
- (viii) Être un traitement prophylactique pour des personnes vulnérables (jeunes enfants et femmes enceintes) : **N.D.**
- (ix) Être sans danger pour les personnes vulnérables (jeunes enfants, femmes enceintes, personnes déficientes pour la G6PDH, infectées par

le VIH ou la tuberculose, mal nourrit, ...) : (✓) pour G6PDH^{-/-} ; **N.D.**

pour les autres

- (x) Être aussi peu cher que la Chloroquine, idéal un traitement devrait coûter 1\$: ✓

Ainsi, bMD1c possède plusieurs de ces caractéristiques définissant un antipaludique prometteur.

Le mécanisme d'action du bMD1c n'est pas encore entièrement élucidé. Plusieurs résultats suggèrent qu'après activation, les dérivés du bMD1c agissent en *redox cyclers* et cause la mort du parasite par augmentation du stress oxydatif.

Mode d'action hypothétique du bMD1c

Le bMD1c est supposée agir en trois temps sur le parasite : (i) perturber l'équilibre oxydatif du parasite par une réaction cyclique continue entre les espèces ferriques du parasite et sa forme réduite et oxydée ; (ii) par consommation du pool de NADPH au sein du normocyte parasité, réduisant les mécanismes de lutte contre le stress oxydatif ; (iii) dénaturation de l'Hb entraînant la précipitation d'hémichromes sur la membrane des normocyte infectés par des parasites de stade anneaux puis la phagocytose de celui-ci. Le mode d'action du bMD1c n'a pas encore été prouvé *in vivo*, mais des études *in vitro* ont permis d'établir un mode d'action hypothétique.

Déséquilibre oxydatif par perturbation du métabolisme GSH et consommation du NADPH

En entrant dans le normocyte parasité, le bMD1c (benzylMD1c sur la figure 6) est oxydée en benzoylMD2c (étape 1). Ce dernier est plus polaire et plus oxydant que le benzylMD1c, ce qui le rend plus susceptible d'accepter des électrons et de devenir un substrat de la GR NADPH-dépendante. Ce métabolite 1 est lui-même réduit en benzoylMD3c par la GR (humaine ou parasitaire) dans le cytosol du normocyte ou du parasite (étape 2). Ces deux premières réactions d'oxydo-réduction utilisent le NADPH de manière continue jusqu'à épuisement du pool de NADPH. Au cours de ce cycle d'oxydo-réduction, un autre métabolite peut être formé, la benzoxanthone 4c. Ce métabolite montre une activité antipaludique dix

fois plus faible que le bMD1c avec les deux souches testées mais il inhibe fortement la formation de la β -hématine (hémazoïne synthétique) en solution, inhibant ainsi la formation de l'hémazoïne. Dans les mêmes conditions, la benzoxanthone 4c est aussi puissante que la chloroquine dans le test d'inhibition de la cristallisation de l'hème en β -hématine (Bielitza et al., 2015).

Dénaturation de l'Hb et phagocytose des normocytes infectés

Le benzoylMD3c réduite possède un site de chélation aux ions ferriques Fe^{3+} *in vitro*. Par ailleurs, le benzoylMD3c permet le transfert des électrons d'espèces oxydantes comme la metHb et l'hème. La metHb est réduite par le benzoylMD3c, la rendant indigeste pour le parasite par un cycle d'oxydo-réduction continue NADPH-dépendant. L'Hb(Fe^{2+}) et l'hème réduit (FPIX(Fe^{2+})) sont des espèces toxiques pour le parasite, inhibent la cristallisation de l'hémazoïne et engendrent une production supplémentaire de ROS. Ces espèces oxydatives déclenchent la réaction de Fenton qui conduit à la destruction de l'hème et à la formation de ferrylhémoglobine (ferrylHb). La ferrylHb amène à la formation d'hémichromes qui précipitent dans la membrane du normocyte infecté. De façon similaire aux normocytes déficient en G6PD, les normocytes infectés par des anneaux traités au bMD1c sont alors phagocytés.

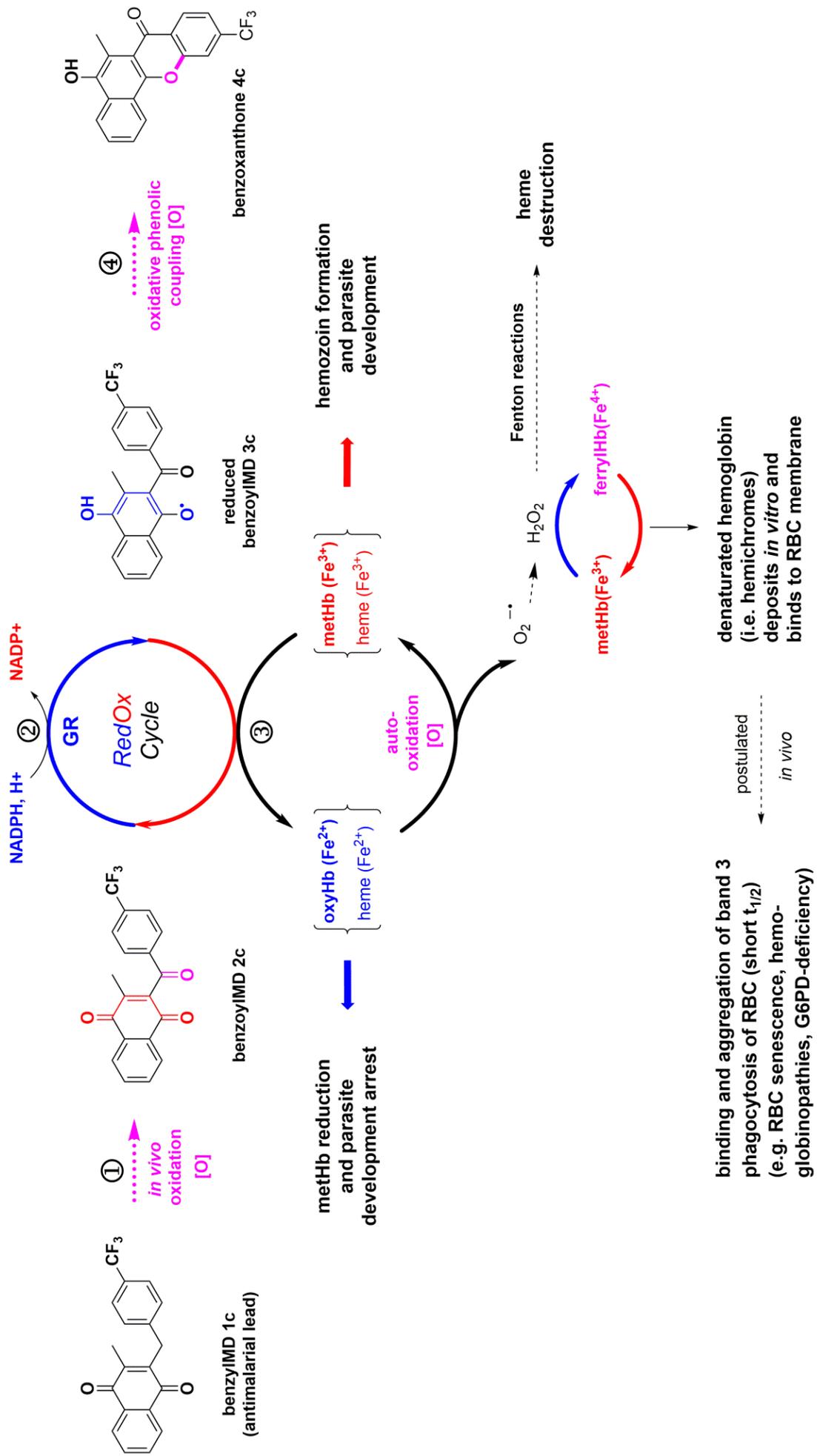


Figure 7 : Mode d'action hypothétique de la benzylMD1c (benzoylMD1c) dans le normocyte parasité

Objectifs du doctorat

Le bMD1c a été synthétisé par le laboratoire d'Elisabeth Davioud-Charvet afin d'inhiber la glutathion réductase. Ce composé a montré des caractéristiques très intéressantes en tant qu'antipaludiques : (i) il tue rapidement les parasites asexués *in vitro* ; (ii) à une IC₅₀ très faible (autour de 50nM) ; (iii) est plus actif sur les stades anneaux (comme l'artémisinine) ; (iv) ne possède pas de résistance croisée avec les souches *P. falciparum* CQ^R (Ehrhardt et al., 2016). Le mode d'action du bMD1c a été caractérisé biochimiquement sur protéines recombinante et semble cohérent avec les observations biochimiques. Le bMD1c ciblerait la GR et (i) réduirait le ratio GSH/GSSG, (ii) consommerait le pool de NADPH, (iii) stopperait le développement du parasite en convertissant la methHB et oxyHB (Bielitza et al., 2015b; Müller et al., 2011).

L'étape suivante était de vérifier si le composé possède une activité double, éliminant à la fois les stades sanguins asexués responsables des symptômes cliniques et les stades sexués, responsable de la transmission au moustique. C'est pourquoi les objectifs de ma thèse ont été centrés sur deux points principaux : l'effet de bMD1c sur la transmission et la caractérisation du mode d'action du bMD1c. Pour ce faire,

- (1) J'ai dans un premier temps développé un protocole robuste pour tester l'effet des molécules antipaludiques sur la transmission du parasite des souris aux moustiques (Chapitre 1)
- (2) Puis j'ai mesuré l'activité de blocage de transmission de bMD1c et de deux de ces dérivés (Chapitre 2) et de la molécule 1o (Chapitre 1)
- (3) Les moustiques sont également exposés à un stress oxydatif importants. Il était donc intéressant de tester l'effet des deux *redox cyclers* bMD1c et bleu de méthylène sur la fitness des moustiques et le développement du parasite à cet instant (Chapitre 1)
- (4) Enfin, j'ai voulu démontrer le mode d'action du bMD1c dans le parasite *in vivo* (Chapitre 3)

CHAPITRE 1 :

DEVELOPEMENT D'UN TEST ANTI-

TRANSMISSION ET CARACTERISATION DES

PROPRIETES ANTI-TRANSMISSION D'UN

COMPOSE ARYLMETHYL-AMINO STEROIDE

Introduction du chapitre 1

Objectif de ce chapitre

Le but de ce chapitre est d'établir la capacité de nouveaux antipaludiques à bloquer la transmission du parasite au moustique. Pour cela, il a fallu mettre en place un protocole robuste. Les protocoles existants (liste développée dans la partie suivante) ne permettaient pas d'intégrer autant de données que nous le souhaitions : l'effet sur la parasitémie et sur la transmission sont mesurés dans deux expériences différentes, les différences de sensibilités des parasites entre les conditions *in vivo* et *in vitro*, et entre espèces *P. falciparum* et *P. berghei*. Nous avons donc développé des essais robustes qui nous ont permis de mesurer plusieurs effets d'antipaludiques sur une même expérience.

Enfin nous avons testé l'effet des *redox cyclers* bleu de méthylène et bMD1c sur les moustiques. Ces composés modifiant l'homéostasie redox, ils pourraient affecter la survie des moustiques ou le développement des parasites.

Mesure de la transmission du parasite au moustique

Une des grandes stratégies mises en œuvre pour stopper la transmission du paludisme est de développer des antipaludiques à effet gamétocytocidal. La majorité de la recherche est concentrée sur les composés ciblant les gamétocytes matures, mais il existe aussi des antipaludiques actifs dans les stades au sein du moustique (Gonçalves & Hunziker, 2016). Différents types d'essais mesurant la transmission existent :

- Les essais sur les gamétocytes permettent d'avoir une idée de l'action sur la transmission d'un composé. Mais en l'absence d'inhibition totale du développement des gamétocytes, l'essai ne peut pas prédire si la transmission sera changée ou non. Si le composé est actif contre les gamétocytes mâles, alors la transmission sera bloquée (Birkholtz, Coetzer, Mancama, Leroy, & Alano, 2016).

- L'exflagellation ou la production de mâles gamètes motiles permet de déterminer si le parasite est fonctionnel ou non pour la fécondation. Les essais sur l'exflagellation des parasites sont reconnus comme des tests robustes pour mesurer la transmissibilité du parasite exposé à un composé.
- Les essais sur les oocinètes ont l'inconvénient de montrer des différences entre les espèces de *Plasmodium*. Sur *P. berghei*, l'essai est robuste et permet de mesurer facilement l'action d'un composé. En revanche sur d'autres espèces telles que *P. falciparum* ou *P. vivax*, produire des oocinètes en routine est impossible (M. J. Delves et al., 2012).
- L'énumération des oocystes reste la méthode standard pour évaluer la transmission du parasite au moustique. L'ingestion des parasites peut se faire sur l'hôte directement (direct feeding assay; DFA) ou par l'intermédiaire d'un repas sanguin sur membrane sur sang complet (direct membrane feeding assay ; DMFA) ou encore par l'intermédiaire d'un repas sanguin sur membrane sur une culture de gamétocytes (standard membrane feeding assay ; SMFA). Tous ces essais sont pertinents biologiquement pour évaluer la transmission par la prévalence et la charge parasitaire dans les moustiques infectés. La prévalence est le pourcentage de moustiques infectés par au moins un parasite relatif au le nombre total de moustiques s'étant gorgés. La charge parasitaire est nombre de parasites par moustique s'étant gorgé. Ces valeurs sont inutilisables si le nombre de moustiques de l'essai est trop petit. Si le SMFA est considéré comme la méthode standard, cet essai est artificiel et ne prend pas en compte des paramètres de l'hôte tels que le métabolisme et la biodisponibilité des composés. C'est pourquoi, le DFA sur *P. berghei* et souris nous a semblé le modèle reflétant le plus la réalité et permettant de mieux évaluer l'action d'un composé sur la transmission bloquée (Birkholtz et al., 2016).
- Enfin les derniers stades les sporozoïtes, peuvent être obtenus par extension d'un essai sur les oocystes. La limite de ces essais est que le seuil de détection des sporozoïtes est très bas, rendant l'essai peu fiable pour l'instant (Sinden et al., 2012).

Systèmes de défense du moustique contre Plasmodium

La souche *Anopheles gambia* a été isolée en Gambie en 1975. Cette souche est aujourd'hui couramment utilisée dans les laboratoires qui ont sélectionné des lignées telles que G3 et L3-5, lignées respectivement sensible et résistant à l'infection de *P. falciparum*. *P. berghei* est aussi utilisé comme modèle d'infection avec la lignée sensible G3. Cette lignée permet des infections avec une forte prévalence et un grand nombre d'oocystes alors que la lignée L3-5 tue tous les parasites (Blandin et al., 2009).

Pour se défendre contre les parasites, le moustique anophèles possède 3 grands systèmes de défense. Le premier système est sa flore intestinale. Les bactéries de l'intestin du moustique peuvent être stimulées par le système immunitaire de ce dernier et réduire l'infection à *Plasmodium*. Il a été montré que des moustiques traités avec un antibiotique gentamycine sont plus permissifs à *Plasmodium*. À l'inverse, des moustiques ayant reçus un surplus de bactéries à ingérer sont moins infectés par *Plasmodium*. L'ensemble des micro-organismes colonisant le moustique influence l'infection à *Plasmodium* en agissant directement sur le développement du parasite ou indirectement par activation du système immunitaire du moustique (Dong, Manfredini, & Dimopoulos, 2009).

Le deuxième système de défense du parasite est basé sur la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS). Ces dérivés agissent en parallèle de TEP1 et sont toxiques pour le parasite. La production de ROS augmente lors d'un repas sanguin mais cette production est plus importante dans les lignées réfractaires que sensibles. Si le niveau de ROS est augmenté de manière artificielle chez des moustiques sensibles ils deviennent plus réfractaires alors que l'administration d'antioxydants à des moustiques réfractaires réduit leur capacité à bloquer le parasite. La production de ROS est donc étroitement liée à l'infection des moustiques (Gupta et al., 2009; Oliveira, Lieberman, & Barillas-Mury, 2012).

Le troisième mécanisme repose sur son système immunitaire dont la Thioester-Containing Protein 1 (TEP1) est l'élément essentiel. Cette protéine est un homologue du facteur de complément C3 et marque les parasites à leur surface

qui sont éliminés par un mécanisme encore obscur. La traversée de l'épithélium du moustique par *Plasmodium* entraîne une production de ROS, accompagnée d'une induction d'enzymes de détoxification (catalase et superoxyde dismutase ou SOD) dans le corps gras afin de contrôler le niveau général des ROS. Lors d'une infection de l'intestin, l'expression de la catalase est spécifiquement réduite. Ce mécanisme de défense est à double face pour le moustique car si les ROS réduisent le nombre de parasites, ils sont aussi délétères pour sa survie et sa reproduction (Blandin et al., 2009).

La présence de *Plasmodium* dans un repas sanguin provoque la production de l'oxyde nitrique synthétase (NOS) dans l'intestin du moustique. L'oxyde nitrique (NO) est une molécule toxique, capable d'induire l'apoptose des oocynètes et également toxique pour les jeunes oocystes.

L'importance du stress oxydatif pour la défense contre le parasite a été confirmée par la découverte de la sécrétion de ROS par les bactéries de l'intestin responsable de la diminution de la survie des parasites (Marois, 2011). Le stress oxydatif tient un rôle clé dans la régulation de l'infection du moustique par *Plasmodium*. Les dérivés réactifs de l'oxygène peuvent être produit par le métabolisme du moustique afin d'endiguer l'infection par *Plasmodium* ou le stress oxydatif généré par ces dérivés pourrait être créé par l'introduction de molécules de synthèse dans le moustique.

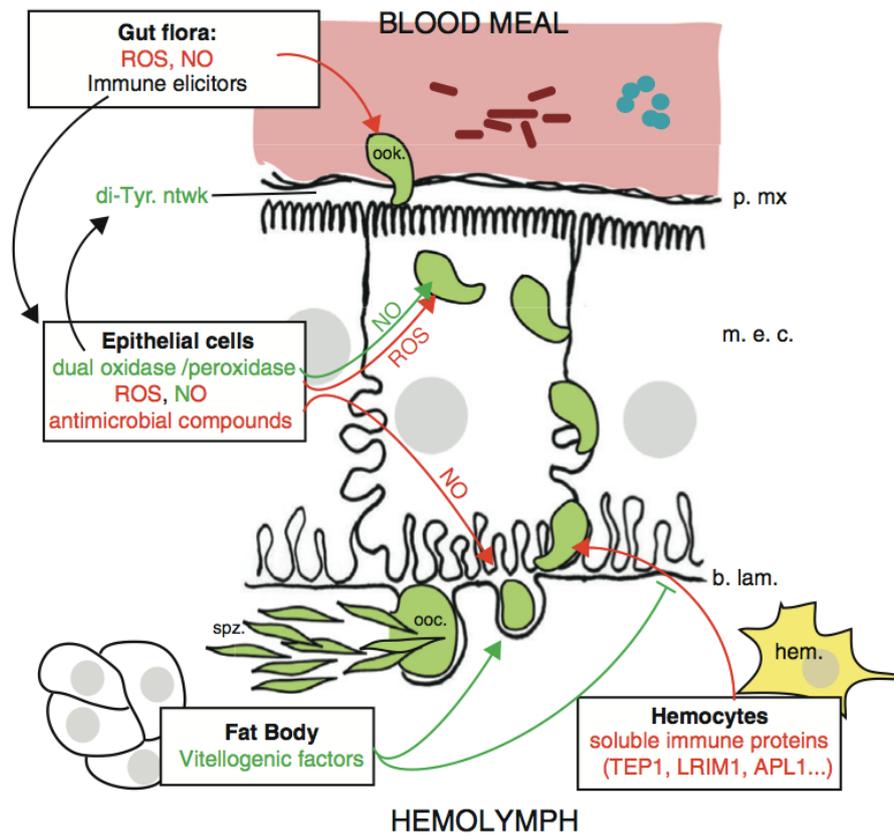


Figure 8 : Schéma récapitulatif des facteurs influençant la survie de *Plasmodium* dans le moustique.

Ce schéma représente une partie de l'épithélium de l'intestin d'un moustique ayant reçu un repas sanguin avec le bol sanguin représenté au dessus et l'hémolymph du moustique représentée en dessous. Les facteurs favorables à *Plasmodium* sont de couleur verte, ceux à son désavantage sont en rouge. Ook. : ookinete ; ooc. : oocyst ; p. mx. : peritrophic matrix ; di-Tyr. Ntwk : di-tyrosine network ; m. e. c. : midgut epithelial cell ; b. lam. : basal lamina ; hem. : hemocyte ; NO : nitric oxide ; ROS : reactive oxygen species (Marois, 2011).

Systèmes oxydatif chez le moustique

Les dérivés réactifs de l'oxygène sont constamment générés par le métabolisme du moustique. Ce phénomène se fait essentiellement dans la mitochondrie où 90% de l'oxygène est consommé par la cellule. Afin de se protéger des dommages fait par ces espèces, les organismes aérobies possèdent un système d'enzymes antioxydantes particulièrement conservées. La différence entre les insectes et les vertébrés est l'absence de la glutathion réductase (GR) et de la glutathion peroxydase (GPX) chez les insectes. Les principales enzymes détoxifiantes sont (1) la superoxyde dismutase (SOD) qui convertit les superoxydes en oxygène et peroxyde d'hydrogène ; (2) la catalase qui change ce peroxyde d'hydrogène en oxygène et eau ; (3) les peroxydases qui réduisent les peroxydes d'hydrogènes en eau en régénérant des accepteurs d'électrons thiorédoxine (TRX) et glutathion (GSH).

Les dérivés réactifs de l'oxygène ne sont pas que ces espèces délétères aux cellules du moustique, elles peuvent avoir un rôle capital dans le système de défense du moustique (Bauer, Kanzok, & Heiner Schirmer, 2002; Corona & Robinson, 2006).

Solubilité et biodisponibilité de bMD1c

La solubilité du bMD1c a été mesurée égale à $0,44 \pm 0,05 \mu\text{M}$. Cette valeur traduit une très faible solubilité : les composés très insolubles sont notés de 0 (pour l'atovaquone) à $1/10 \mu\text{M}$ (cf figure 25 page 77). Le fort caractère hydrophobe de bMD1c pourrait être en lien direct avec son manque de biodisponibilité *in vivo*. Lors du passage de l'*in vitro* à l'*in vivo*, le bMD1c est beaucoup moins efficace pour éliminer les stades asexués chez la souris (Müller et al., 2011). L'importance de la faible biodisponibilité du bMD1c sera évoquée dans les chapitres 1 et 2 essentiellement.

Matériel et méthode du chapitre 1

Élevage des moustiques

Les moustiques *Anopheles gambiae* et *coluzzii* de souche G3 (appelés TS1 et G3L) sont élevés à l'IBMC selon la procédure décrite dans la publication (Richman et al., 1997). Les deux lignées TS1 et G3L sont des *Anopheles gambiae* possédant la forme moléculaire S. Les G3L sont également des moustiques de lignées G3 obtenus à partir de deux lignées transgéniques de fond génétique G3 et les porteurs des deux formes moléculaires M/S (cf figure 9).

Lignées	SineX	2La	TEP1
TS1	S (<i>gambiae</i>)	2La ^{+/+}	S1/S1
G3L	M/S (<i>coluzzii/gambiae</i>)	2La ^{-/+}	S/S

Figure 9 : Génotypage des deux lignées TS1 et G3L

Ingestion des composés par les moustiques

Les solutions de bMD1c ou de bleu de méthylène (Sigma) sont conservées à 10mM dans du DMSO et de l'eau, respectivement. Ces solutions sont diluées dans de l'eau pour atteindre les concentrations finales de 5% sucrose à 2.5mM pour le bleu de méthylène et 50µM dans 0.5%DMSO pour le bMD1c. Les solutions sont introduites séparément dans un Eppendorf de 1.5mL avec une languette de papier Whatman plié afin de permettre l'atterrissage des moustiques désireux de se nourrir (cf figure 17 – photo de la partie III). (i) Soit les moustiques reçoivent leur apport en sucrose + composé par ce système dès leur émergence jusqu'au repas sanguin infectieux (3jours) ; (ii) soit ils reçoivent d'abord un apport en sucrose (10%) pendant 3 jours avant un repas sanguin infectieux puis ils reçoivent le mélange bleu de méthylène, bMD1c ou DMSO après le repas sanguin infectieux. Tous les moustiques sont disséqués 7 jours après le repas sanguin.

Pour éliminer une partie de la flore intestinale des moustiques, un cocktail d'antibiotiques (Antibiotics antimycotic Solution 100x, Sigma) contenant de la pénicilline (10000 unités), de la streptomycine (10mg) et de l'amphotéricine B (25ug/mL) est mélangé à l'apport en sucrose (concentrations de 10x d'antibiotiques/antifongique dans 10% sucrose/H₂O) dès l'émergence et pendant 3 jours. Un repas sanguin est effectué avec une souris infectée (parasitémie entre 3 et 4 %) avant de placer les moustiques à 21°C. Pendant les 7 jours entre le repas sanguin et la dissection, les moustiques ingèrent soit du bleu de méthylène, du bMD1c, du DMSO ou de l'eau dans 5% sucrose.

Les intestins des femelles qui se sont gorgées sont disséqués dans du PBS. Chaque intestin est photographié au microscope à fluorescence Nikon AZ100 et les parasites fluorescents sont comptés sur imageJ avec le programme watershed. La prévalence (pourcentage de moustiques infectés) et la charge parasitaire (nombre moyen de parasites dans chaque intestin infecté) sont représentées en graph avec le logiciel Prism.

Injection des composés dans les moustiques

Les solutions de bMD1c ou de bleu de méthylène (Sigma) sont conservées à 10mM dans du DMSO et de l'eau, respectivement. Ces solutions sont diluées au 1 : 10 dans de l'eau avant d'être injectées aux moustiques (concentrations finales est de 1mM pour le bleu de méthylène (H₂O) et pour bMD1c (10% DMSO)).

Les micro-injections sont réalisées (i) avant ou (ii) après un repas sanguin. Dans le cas (i), des femelles adultes âgées de 2 jours sont micro-injectées et autorisées à récupérer à 28°C pendant 24h avant de se voir offrir un repas sanguin sur une souris infectée (parasitémie entre 3 et 4 %). Dans le cas (ii), des femelles adultes âgées de 3 jours se voient offrir un repas sanguin sur une souris infectée (parasitémie entre 3 et 4 %). Les femelles s'étant gorgées sont placées à 21°C pendant 24h avant d'être micro-injectées.

Dans les deux cas, les moustiques gorgés sont placés à 21°C et conservés 7 jours avant de disséquer les intestins dans du PBS. Chaque intestin est photographié au microscope à fluorescence Nikon AZ100 et les parasites fluorescents sont comptés sur image avec le programme watershed. La prévalence (pourcentage

de moustiques infectés) et la charge parasitaire (nombre moyen de parasites dans chaque intestin infecté) sont représentées en graph avec le logiciel Prism.

Élevage des souris

L'élevage et les expérimentations animales décrites dans cette partie, ont été réalisées à l'Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire (Strasbourg, France) dans des installations et selon des protocoles approuvés par la législation française pour le bien être animal. Le projet (04480.02) et le bâtiment (numéro d'agrément de l'institut F674822) ont été approuvés par les autorités françaises.

Passage du parasite Plasmodium berghei

Les souris CD1 sont infectées par le parasite *Plasmodium berghei* de la souche ANKA et exprimant de façon constitutive la GFP (Green Fluorescent Protéine) ou la GFP-luciférase. Pour passer le parasite d'une souris à l'autre, une ponction cardiaque est réalisée sur une souris donneuse avec une parasitémie entre 3-5%. Le sang collecté est dilué dans du PBS fin d'obtenir une concentration de 10^8 érythrocytes infectés/mL. 0.2mL de ce mélange est injecté à une souris donneuse par voie intravéneuse. La parasitémie de la souris est suivie par cytométrie (FACSCalibur™, BD Bioscience) ou par frottis sanguin coloré au Giemsa.

Capacité d'un composé à bloquer de la transmission in vivo

Le composé 1o est resuspendu dans une solution de Tween80/éthanol absolu (7 :3), suivi d'une dilution 10x dans l'eau afin d'atteindre la concentration finale de 10mg/mL. Le ProveBlue est une solution commerciale de bleu de méthylène ne contenant aucun métal lourd (5mg/mL) et a été choisi comme contrôle positif. Les deux solutions sont injectées quotidiennement (24h, 48h et 72h post passage) par voie intra péritonéale (i.p.) à une dose de 100mg/kg et 15mg/kg respectivement. Le contrôle négatif est un groupe de souris injectées en i.p. avec une quantité équivalente de véhicule des composés.

La parasitémie des souris est mesurée quotidiennement par cytométrie (FACSCalibur™, BD Bioscience). En parallèle, des groupes de 40 femelles *Anopheles gambiae* (adultes de 4-7 jours) prennent un repas sanguin sur les souris traitées et contrôles 48h, 72h et 96h post passage (un groupe de 40

femelles moustiques par souris et par jour). Pour cela, les souris sont anesthésiées par injection i.p. de 5% Rompun® (Xylazine) et 10% Imalgène® (Ketamine) diluée dans du PBS (100 µl pour 10 g de souris) puis exposées aux piqûres de moustiques pendant 15 minutes. Seules les femelles qui se sont gorgées sont conservées pendant 7 jours avant d'être disséquées dans du PBS pour récupérer leur intestin. Chaque intestin est photographié au microscope à fluorescence Nikon AZ100 et les parasites fluorescents sont comptés sur image avec le programme watershed. La prévalence (pourcentage de moustiques infectés) et la charge parasitaire (nombre moyen de parasites dans chaque intestin infecté) sont représentées en graph avec le logiciel Prism. Trois expériences indépendantes ont été menées et la significativité des traitements, du temps et des répétitions a été calculée avec un « generalized linear models » du software JMP® software (SAS).

Inhibition de la maturation de Plasmodium berghei in vitro

La sensibilité des stades asexués de *P. berghei* au composé 1o a été déterminée en mesurant l'activité de la luciférase de parasites l'exprimant constitutivement après une incubation de 24h *ex vivo* avec différentes concentrations de composé. Le sang de la souris infectées (parasitémie 1-3%) est collecté par ponction cardiaque et lavé à deux reprises dans du milieu RPMI 1640 à 25% de sérum de veau foetal (SVF). Le sang lavé est resuspendu dans ce même milieu à une hématocrite de 4% et exposé pendant 24h à une dilution de 1o ou de bleu de méthylène (Sigma) (0, 1, 3, 10, 30, 100, and 300 nM).

Pour cela, les composés 1o et bleu de méthylène sont dissous dans du DMSO ou de l'eau respectivement à une concentration de 10mM avant d'être dilués dans du milieu de culture aux concentrations indiquées précédemment. 50µL de ces solutions sont répartis en triplicatas dans une plaque 96 puits noire contenant 50µL de sang à 4% hématocrite (hématocrite finale de 2%). La plaque est incubée pendant 24h à 37°C dans une atmosphère à 5% O₂, 5% CO₂, et 90% N₂, puis centrifugée 1min à 1900 rpm, le surnageant est retiré avant de congeler les plaques à -80°C.

Détermination des IC_{50} sur les gamétocytes de *Plasmodium falciparum* *in vitro*

La sensibilité des gamétocytes de *P. falciparum* au composé 1o a été déterminée en mesurant l'activité de la luciférase de parasites l'exprimant spécifiquement à ce stade après une incubation de 72h *in vitro* avec différentes concentrations de composé. La souche de parasite pfs16-GFP-Luc (NF54 background) est maintenue entre 1 et 10% de parasitémie dans du milieu RPMI 1640 avec des globules rouges du groupe A (hématocrite de 2%) et dans 10% de sérum décomplémenté, 9 mM (0.16%) glucose, 0.2 mM hypoxanthine, 2.1 mM L-glutamine, et 20 µg/ml gentamicine. Les parasites sont incubés à 37 °C dans une atmosphère de 5% O₂, 5% CO₂, et 90% N₂. Les stades asexués sont d'abord synchronisés dans du 5% D-sorbitol (poids/vol) pendant 10min à 37°C sur deux cycles ou plus si nécessaire. Les cultures synchronisées sont cultivées dans des boîtes de petri jusqu'à atteindre 10% de parasitémie au stade anneau. À ce stade, la gamétogénèse est induite en nourrissant les cultures d'un mix de milieu frais et de milieu vieux (1 :1) (moins on a d'anneaux, plus on garde de milieu). Le jour suivant, les trophozoïtes sont dilués par 4. Deux jours après l'induction (après la rupture des schizonts), un traitement au N-acétyl glucosamine (NAG ; Sigma) est ajouté à la culture à une concentration finale de 50mM. Ce traitement au NAG pendant les 2 ou 3 prochains cycles de réinvasion permet d'éliminer les stades asexués ne s'étant pas convertit en gamétocytes. Les jeunes gamétocytes immatures (stades I et II) sont purifiés sur un gradient de percoll et incubés dans des plaques à 96-puits à 9%, 12%, ou 45% gamétocytémie en fonction de l'expérience (150 µl/well). Les cultures de gamétocytes sont exposées pendant 72h à différentes dilutions de 1o, de bleu de méthylène (Sigma) ou de milieu démarrant 3, 8 ou 11 jours après l'induction de la gamétogénèse. Pour cela, les composés 1o et bleu de méthylène sont dissous dans du DMSO ou de l'eau respectivement à une concentration de 10mM avant d'être dilué dans du milieu de culture aux concentrations appropriées (150µL à 2% hématocrite en triplicata pour chaque concentration). Après l'exposition aux composés, les parasites sont cultivés 2 jours de plus dans du milieu de culture avant que la plaque soit centrifugée 1min à 1900 rpm, le surnageant est retiré avant de congeler les plaques à -80°C.

Détection de la luciférase des essais in vitro sur P falciparum et berghei

Les plaques congelées à -80°C sont incubées à 37°C pendant au moins 30min. les cellules sont lysées à température ambiante avec 10µL de 1x luciferin lysis buffer (Luciferase Cell Culture Lysis 5x reagent, Promega). Les plaques sont ensuite lues sur le fluorimètre à microplaques GloMax®-multi à un injecteur pour 100µL de luciferase assay substrate (Luciferase Assay System, Promega) par le programme Luciferase Assay System, Promega. Une seconde lecture est réalisée avec le programme BrightGlo (lecture en balayage sans ajout de composé) à la fin du premier programme, pour la vérification des variations intra-plaque. La moyenne de chaque triplicata est calculée puis normalisée selon la formule : $(Luc_x - Luc_{RBC}) / (Luc_{solvent} - Luc_{RBC})$ avec Luc_x et $Luc_{solvent}$ = moyenne de l'activité luciférase pour les parasites incubés avec le composé x et le solvant (DMSO ou PBS), et Luc_{RBC} = moyenne de l'activité luciférase sur les érythrocytes non infectés (background). Les valeurs d'IC₅₀ ont été calculées avec le logiciel Prism (GraphPad, log(inhibitor) vs. normalized response – variable slope) pour 3 expériences différentes pour l'essai sur les gamétocytes *P. falciparum* et 5 pour l'essai sur les stades asexués de *P. berghei*.

Peter's test

L'infection des souris se fait au jour 0 avec une souche de *P. berghei* GFP ANKA. Lorsque la souris donneuse présente une parasitémie d'environ 30%, elle est ponctionnée pour récupérer le sang, qui est dilué dans du PBS à 10⁸ érythrocytes parasités/mL. Un échantillon de 0.2mL de cette suspension est injecté par voie intraveineuse à des souris naïves. Les souris contrôles non traitées atteignent une parasitémie de 30% dans les 3 jours après le passage et doivent être sacrifiées entre les jours 6 et 7 post passage. Le composé 1o est préparé à la concentration appropriée dans une solution de Tween 80 / alcool (7:3, Tween 80 et éthanol absolu, respectivement), suivi d'une dilution au 1 :10 dans l'eau. Les souris reçoivent 4 doses du mélange précédent (4 h, 24 h, 48 h, 72 h post-infection) par injection intra-péritonéale à 100mg/kg. La parasitémie des souris est mesurée quotidiennement par cytométrie (FACSCalibur™, BD Bioscience). La

parasitémie 96h post passage sert au calcul de l'efficacité des composés selon la formule suivante :

$$\text{Efficacité} = \frac{\text{Moyenne contrôle} - \text{Moyenne composé X}}{\text{Moyenne contrôle}} * 100$$

Plus le pourcentage d'efficacité est élevé, plus le composé est apte à éliminer les parasites *in vivo*.

Résultats du chapitre 1

Partie I – Mise en place d'un modèle de transmission *in vivo*

Nous avons dans un premier temps développé un protocole afin de mesurer l'activité des différents composés à tester sur le développement du parasite *in vivo* et sur sa transmission au moustique. Pour ce faire, des moustiques ont été nourris sur des souris infectées traitées avec les composés sur plusieurs jours, et nous avons suivi la parasitémie des souris et l'infection des moustiques. Certaines conditions, listées ci-dessous, ont dû être optimisées.

Influence de la souche des souris

Lors de l'application de notre premier protocole, comprenant un passage i.p. suivi 3 jours après de la première injection des composés, nous avons observé des différences entre les souches de souris CD1 et les C57BL/6. Pour un antipaludique décrit plus loin, le 1o, l'efficacité du composé administré au même dosage par le même procédé est de 80.7% chez les C57BL/6 et de 63.7% pour les CD1. Des différences sont observées en fonction des souches de souris utilisées. Par ailleurs, nos collaborateurs du Swiss Tropical and Public Health Institute ont mesuré une efficacité de 99.8% pour ce même composé *in vivo* avec un protocole différents du nôtre. En suivant le même protocole que nos collaborateurs, nous avons mesurés cette fois une efficacité 87.2%. Des différences sont également observées en fonction du protocole utilisé (figure 10).

	Passage i.v. + injection 4 heures post passage		Passage i.p. + injection 3 jours post passage	
Lieux	Swiss TPH	IBMC	IBMC	IBMC
Souche de souris	NMD1	CD1	CD1	C57BL/6
Efficacité de 1o	99.8 %	87.2 %	63.7 %	80.7 %

Figure 10 : Efficacité du composé 1o en fonction de la souche de souris ou du protocole.

Ce tableau compare les efficacités mesurées au Swiss TPH à Bâle et à l'IBMC pour le composé 1o. Les expériences réalisées à l'IBMC incluent 2 souris pour chaque efficacité calculée.

Lorsqu'un même protocole, appelé Peter's test est appliqué aux souris CD1 et NMD1, l'efficacité de ce composé est similaire d'une souche à l'autre. Ainsi, le protocole d'infection/injection utilisé peut modifier l'efficacité d'un antipaludique.

Le Peter's test possède plusieurs variantes sur notre protocole (i) le passage est réalisé à partir d'une souris infectée dont la parasitémie de 30%, (ii) en i.v., et (iii) l'administration des composés se fait sur parasitémie très basse, 4h post passage.

Nous avons donc testé ces différences afin d'établir un protocole à la fois robuste et proche de la réalité sur le terrain.

Influence du type de passage et de la parasitémie de la souris donneuse

Les passages réalisés par voie i.p. injectent les parasites dans la cavité péritonéale. Ce mode de passage est à l'origine d'une perte de parasites qui ne peut être contrôlée et la parasitémie des souris infectées par passage i.p. est moins reproductible. Des souris injectées en i.p. au même moment avec le même

inoculum présentent des parasitémies différentes, variant de 3 à 5% à 3 jours post passage (figure 11 A).

Le passage par injection i.v. transmet les parasites d'une circulation sanguine à l'autre. Ce type de passage permet d'obtenir des parasitémie très similaires et reproductibles à 2 et 3 jours post passage et permet de réduire la variabilité intra-expérience liée aux souris et de rendre les regroupements et les comparaisons plus justes (figure 11 B).

Une autre particularité du Peter's test est que la parasitémie de la souris donneuse est très élevée, 30%. Or les parasites provenant de souris à l'infection si élevée se développent moins vite que ceux provenant d'une souris infectée à 3% (figure 11 B et C). *P. berghei* envahit préférentiellement les réticulocytes. Or ces érythrocytes immatures ne composent que 2% de la population des cellules sanguines circulantes. Si la parasitémie dépasse ces 2%, le parasite *P. berghei* envahit les normocytes pour lesquels il a moins d'affinité. Et lorsque des réticulocytes sont à nouveau disponibles, les parasites *P. berghei* envahissent à nouveau les réticulocytes, notamment lors d'un passage d'une souris donneuse à 30% à une souris naïve.

Ces changements de préférence d'invasion pourraient changer la sensibilité des parasites à un antipaludique. Le normocyte est une cellule hôte inadaptée pour *P. berghei*, il est possible que le parasite soit alors plus fragile que dans le réticulocyte dont il peut utiliser le métabolisme. Or sur le terrain, les parasitémie n'atteignent jamais des valeurs aussi élevées. Pour souci de justesse de notre modèle, nous avons choisi de garder les souris donneuses à 3% au lieu de 30%.

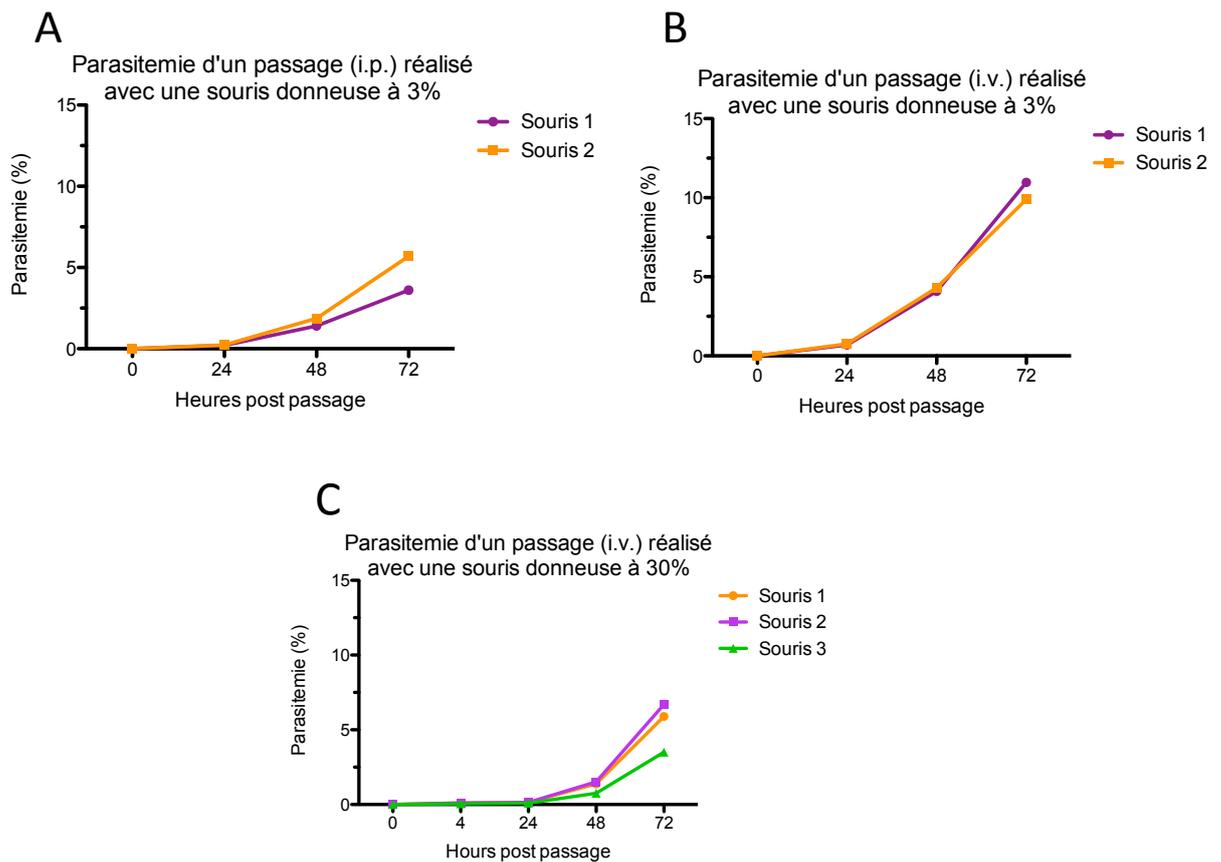


Figure 11 : Évolution de la parasitémie en fonction du type de passage et de la parasitémie de la souris donneuse.

A : Évolution de la parasitémie de deux souris infectées par voie i.p. avec une souris donneuse à 3%. B : Évolution de la parasitémie de deux souris infectées par voie i.v. avec une souris donneuse à 3%. C : Évolution de la parasitémie de trois souris infectées par voie i.v. avec du sang provenant d'une souris infectée à 30%. Les parasitémies sont contrôlées par FACS.

Un passage de type i.v. à partir d'une souris donneuse infectée à 3% a été adopté (au lieu de i.p.) pour la suite des expériences.

Après le type de passage, la deuxième différence avec le Peter's test est la durée entre le passage et la première injection des composés (4h post passage contre 3 jours avec notre premier modèle).

Influence de la durée entre le passage et la première injection d'antipaludique

La durée entre les injections des parasites et le composé implique aussi une différence de parasitémie. À 3 jours post passage avec un passage i.p. de notre ancien modèle, la parasitémie se situe entre 3 et 5%, alors que 4h post passage i.v., la parasitémie est inférieure à 0.1%.

Cette différence pourrait être une raison de la baisse d'efficacité d'un composé sur une parasitémie développée, où le parasite a déjà réalisé au moins 2 cycles. Le composé est alors réparti sur un plus grand nombre de parasites et touche une proportion de parasite moins importante.

Mais dans le souci de créer un modèle correct avec la réalité sur le terrain, une injection des composés 4h après celle des parasites, ne paraît pas appropriée. Nous avons donc choisi de réaliser l'injection des composés 24h post passage, à une parasitémie de ~1%.

Une autre différence notée dans le protocole de nos collaborateurs de Bâle est le véhicule utilisé pour les composés testés.

Influence du véhicule utilisé pour les composés antipaludiques

Dans notre premier modèle, le véhicule utilisé pour les composés est un mélange à 10% DMSO dans une solution à 5% glucose/PBS. Les souris traitées avec ce mélange montraient des symptômes prononcés plus rapidement que les souris traitées au PBS, nous obligeant à les sacrifier avant la fin de l'expérience pour des raisons éthiques. Cela nous privait d'un contrôle pour les derniers jours d'expériences. Au Swiss TPH, le véhicule utilisé est un mélange à 10% de Tween80/EtOH (70%/30%) dans de l'eau. Les deux véhicules ont été comparés par l'attribution de scores cliniques aux souris infectées et recevant 1 injection pendant 3 jours consécutifs. Les souris atteignant le score le plus élevé sont sacrifiées.

En comparant les scores cliniques (figure 12), il est évident que le mélange Tween80/EtOH est moins toxique que celui au DMSO. L'état prostré est atteint au bout de 1 à 3 jours pour le DMSO alors que les souris ayant reçu du PBS ou le mélange Tween80/EtOH n'atteignent ce score que le jour 4 et présente une

aggravation beaucoup moins rapide. Le DMSO en tant que véhicule a donc été remplacé par le mélange de Tween80/EtOH.

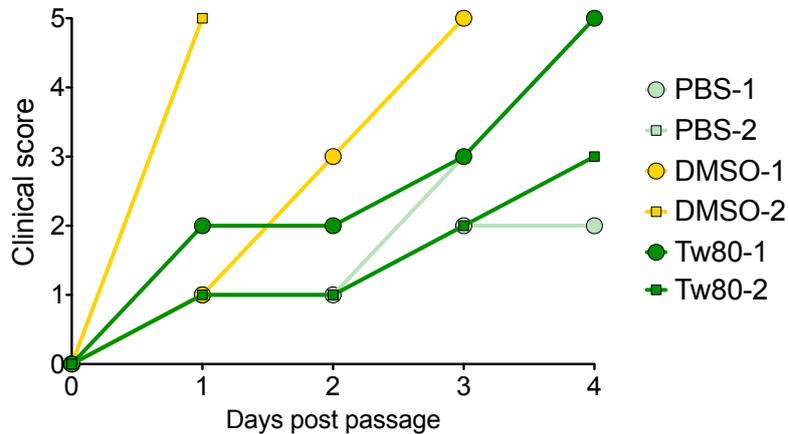


Figure 12 : Évolution du score clinique de souris infectées et injectées avec du véhicule.

L'infection a été réalisée par voie i.v. avec du sang provenant d'une souris infectée à 3%. Chaque souris reçoit une dose des différents véhicules (DMSO et tween80) par injection i.p. quotidienne pendant 3 jours consécutifs débutant 1 jour post passage. Les scores cliniques sont attribués selon l'attitude des souris s'échelonnent de 0 à 5. Les extrêmes sont 0 = pas de symptôme, 1 = pelage négligé et 4 = déplacements lents, 5 = animal prostré.

Influence de la durée entre l'anesthésie du repas sanguin et l'injection des composés

L'heure d'injection des composés influe également sur l'efficacité des composés *in vivo*. Nous avons constaté que le blocage de la transmission se faisait beaucoup moins efficacement lorsque le composé était injecté trop tôt après l'anesthésie de la souris pour le repas sanguin des moustiques (figure 13).

Deux raisons de cette baisse d'efficacité sont possibles : (i) lorsque l'injection des composés est réalisée sur des souris anesthésiées, une interaction est possible entre l'anesthésique et le composé, (ii) le développement du parasite étant globalement synchrone avec un cycle de 24h, et l'activité du composé différant en fonction du stade parasitaire, l'activité des composés peut varier au cours de la journée.

Pour la suite des expériences, nous avons choisi de réaliser les repas sanguins comprenant l'anesthésie des souris à 8h le matin, d'attendre 12h et d'injecter les composés à 8h le soir. Ainsi chaque étape d'injection d'anesthésique ou de composé est espacée de 12h, s'assurant que l'anesthésique a bien été éliminé par le métabolisme de la souris et n'interfère pas avec le composé.

De plus à 8h le soir, les parasites sont au stade de schizontes matures et vont exploser pour libérer des mérozoïtes qui deviendront de nouveaux stades anneaux ou des gamétocytes. Injecter les composés à ce moment, afin d'être sûr d'exposer les jeunes gamétocytes est une bonne perspective.

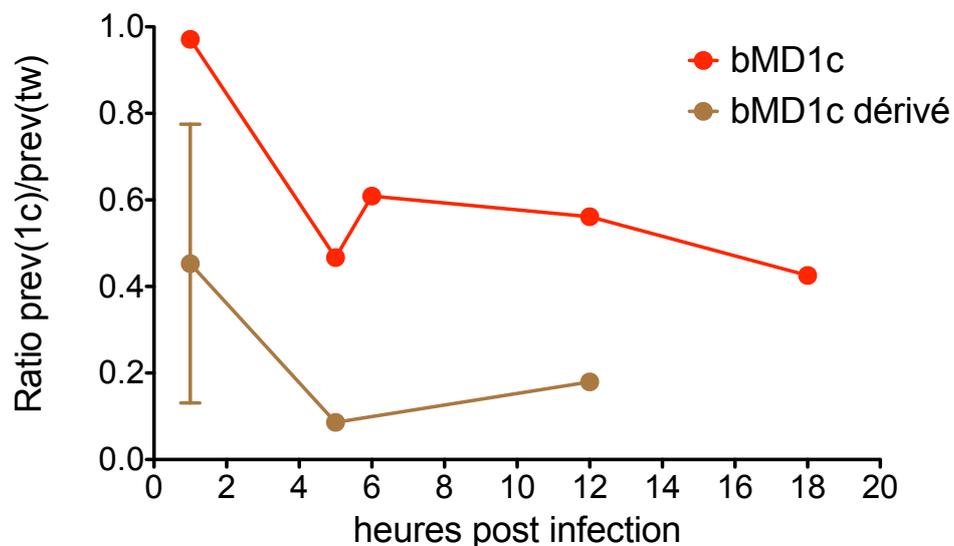


Figure 13 : Ratio de la prévalence entre des groupes de moustiques nourris sur souris traitées avec bMD1c, un dérivé ou avec le véhicule.

Plus les composés sont injectés tôt après le repas sanguin (et l'anesthésie de la souris), moins ils sont efficaces.

Partie II – le potentiel des arylméthylamino stéroïdes comme nouvel antipaludique

L'équipe du professeur Katja Becker a tenté une nouvelle approche pour générer un nouvel antipaludique novateur. Ils ont combiné un squelette stéroïde avec des structures dont l'activité biologique était prometteuse puis réalisé un criblage afin de sélectionner les meilleurs composés contre le parasite. Plusieurs composés ont montré une activité contre *Plasmodium*. Ces derniers ont été optimisés jusqu'à la sélection des (arylméthyl-)amino stéroïdes présentant une activité antipaludique exceptionnelle (Wittlin et al., 2017).

Parmi cette famille de composés, un composé agissait plus efficacement, le 1o. Le composé 1o est actif *in vitro* contre *P. falciparum* 3D7 et Dd2 avec des IC₅₀ de 3.6 ± 1.6 nM et 1.0 ± 0.9 nM respectivement. Les résultats du Peter's test pour 1o mettent en évidence une réduction la parasitémie *in vivo* avec une efficacité de 99.8% par injection i.p. mais aussi par ingestion per os avec une efficacité de 98.5%. Ce composé possède un bon profil pharmacocinétique et une faible cytotoxicité et aucune toxicité *in vivo*.

Le mode d'action par lequel cette famille de molécules agit est méconnu. Le groupe stéroïde lipophile confère une grande biodisponibilité aux composés, leur permettant de traverser aisément les membranes. Les propriétés antipaludiques proviendraient essentiellement du groupe (arylméthyl-)amine qui peut chélater avec les ions métalliques et l'hème, perturbant la digestion de l'hème par le parasite et augmentant son stress oxydatif (Wittlin et al., 2017).

Ma contribution à ce travail a été de tester la capacité du 1o à (i) éliminer les gamétocytes *P. falciparum* *in vitro* et (ii) bloquer la transmission du parasite au moustique *in vivo*.

Le composé 1o est très efficace sur P. berghei in vitro

L'activité *in vitro* du composé 1o contre *P. berghei* est très similaire à celle qui avait été mesurée sur *P. falciparum* avec des IC₅₀ de 3nM et 6nM respectivement (figure 14). Le 1o est très efficace à tuer les deux espèces de parasites à de très faibles concentrations *in vitro*.

Agent	IC ₅₀ ± SD (nM)	
	<i>Pf</i> (t = 72h)	<i>Pb</i> (t = 24h)
CQ	10 ± 0.6	245 ± 177
ART	8.3	35.5 ± 35
MB	3.1 ± 0.4	17.8 ± 4.3
1o	5.8 ± 2.1	3.1 ± 2.4

Figure 14 : Activité *in vitro* du composé 1o et de plusieurs antipaludiques contrôles sur les parasites *P. falciparum* et *P. berghei*.

CQ : chloroquine ; ART : artémisinine ; MB : bleu de méthylène ; 1o : composé leader des (arylmethyl-)amino stéroïdes. Expériences menées 3 fois de façon indépendante.

Le composé 1o est très efficace sur P. berghei in vivo

L'activité de 1o *in vivo* sur les parasites *P. berghei* avait été testée avec le Peter's test. Nous avons vérifié cette activité avec notre modèle d'infection. Notre modèle d'infection est différent du Peter's test de part la première injection du composés 24h après le passage au lieu de 4h pour le Peter's test. Notre première injection se fait donc sur une parasitémie de 1%. La parasitémie des souris traitées avec le véhicule augmente jusqu'à 10% dès 3 jours post passage (figure 15). Les souris traitées au bleu de méthylène présentent une parasitémie qui ne dépasse pas les 1% et est quasi nulle 4 jours post passage. Le composé 1o réduit de manière significative la parasitémie par rapport au contrôle tween mais est

moins efficace que le bleu de méthylène. Cependant son efficacité (calculée sur le modèle du Peter's test) est de 79% à 4 jours post passage.

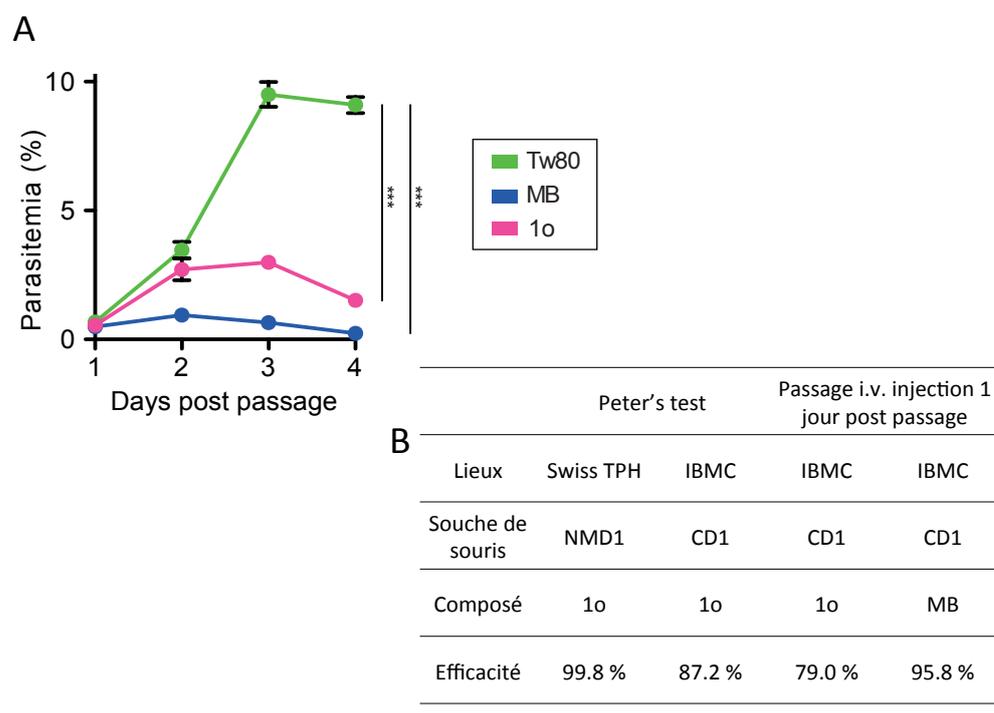


Figure 15 : Activité *in vivo* du composé 1o.

(A) Évolution de la parasitémie. Les souris reçoivent une injection de composés pendant 3 jours consécutifs, commençant 1 jour post passage. 1o : composé leader de la famille des (arylméthyl-)amino stéroïdes (100mg/kg) ; MB : bleu de méthylène (15mg/kg) ; Tween80 = véhicule (70% tween80, 30% EtOH, 1/10 dans H₂O). La parasitémie est surveillée quotidiennement par cytométrie en flux. (B) Efficacité du bleu de méthylène et de 1o calculée avec le Peter's test et notre modèle. Ces expériences ont été réalisées 4 fois de façon indépendante.

Le composé 1o bloque la transmission du parasite au moustique

La réduction de la transmission du parasite au moustique peut se montrer par une diminution de la prévalence (pourcentage des moustiques infectés par au moins un parasite) ou de la charge parasitaire (nombre de parasites par intestin de moustique). Le bleu de méthylène est ici utilisé comme contrôle positif car c'est antipaludique connu pour sa capacité à bloquer la transmission.

Les groupes de moustiques nourris sur les souris traitées au tween80 sont presque tous infectés avec une haute charge parasitaire (\approx 110 parasites/moustiques) durant les 3 jours (figure 16). Le bleu de méthylène bloque presque complètement la transmission dès la première injection et ceux sur les 3 jours du test. Le composé 1o réduit la prévalence de manière significative dès la première injection et la bloque complètement après 3 injections. Le profil obtenu avec la charge parasitaire est très similaire de celui des prévalences avec une réduction du nombre de parasite dès la première injection de 1o, jusqu'à n'avoir aucun moustique porteur de parasite.

L'effet sur la transmission peut être dû soit à la capacité du 1o à éliminer rapidement les parasites asexués préalablement au repas sanguin des moustiques, soit à une action directe sur les gamétocytes, stades permettant la transmission du parasite au moustique.

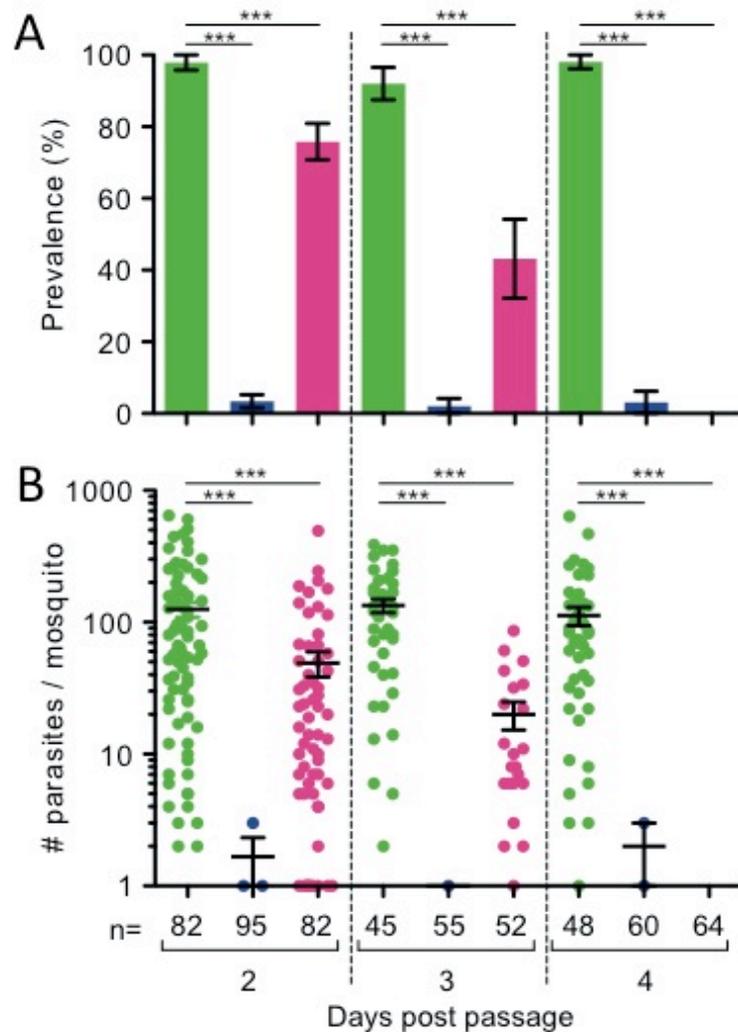


Figure 16 : Capacité du composé 1o et du contrôle bleu de méthylène à bloquer *in vivo* la transmission du parasite *P. berghei* au moustique *A. gambiae*.

La figure montre l'effet sur la (A) prévalence de l'infection et (B) la charge parasitaire. 1o : composé leader de la famille des (arylmethyl-)amino stéroïdes (100mg/kg) ; MB : bleu de méthylène (15mg/kg) ; Tween80 = véhicule (70% tween80, 30% EtOH, 1/10 dans H₂O). Les souris reçoivent 1 injection par jour pendant 3 jours consécutifs. Cette expérience a été réalisée 4 fois de façon indépendante.

L'effet du composé 1o sur les gamétocytes de *P. falciparum* in vitro

Les gamétocytes sont le stade permettant au parasite d'infecter les femelles moustiques anophèles lorsque celles-ci prennent un repas sanguin sur un humain infecté. Pour déterminer l'action des composés sur ce stade, nous les avons exposés à différents stades de maturation à concentrations croissantes pendant 72h. Le bleu de méthylène, connu pour son activité anti-gamétocyte (Adjalley et al., 2011), est utilisé comme contrôle positif et c'est montré très efficace avec des IC₅₀ de l'ordre du nanomolaire pour tous les stades de gamétocytes.

Le 1o réduit la gamétocytémie à des concentrations relativement faibles (~100-1000 nM) contre tous les stades (II-III, IV et V). Cependant cette tendance s'inverse pour les concentrations supérieures à 5 µM (figure 17).

L'ensemble de ces résultats suggère que le blocage de la transmission observé précédemment est dû à un effet direct du 1o sur les gamétocytes appuyé par l'activité très forte du 1o sur les stades asexués.

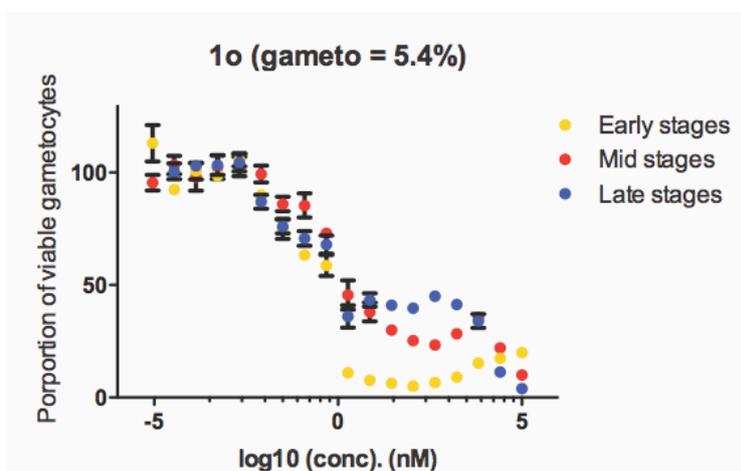


Figure 17 : Courbe représentative de l'effet du composé 1o sur les gamétocytes *P. falciparum* à différents stades (early stages = stades II-III ; mid stages = stade IV ; late stages = stade V). Le taux de survie des gamétocytes a été calculé pour chaque concentration par rapport aux parasites exposés au véhicule. Cet essai a été réalisé 3 fois de façon indépendante avec une gamétocytémie comprise entre 5 et 12%.

Partie III – Ingestion et injection des composés dans le moustique

L'introduction des composés dans le moustique peut avoir une influence sur leur fitness. Dans chacune des expériences suivantes, la survie des moustiques est suivie afin de déterminer l'impact des composés. Dans un second temps, le développement des parasites chez le moustique est surveillé. Lors des premières phases de leur cycle, les parasites se développent dans le lumen puis traversent l'épithélium, dans la partie basale de l'intestin du moustique. Une différence notable avec les stades chez l'Homme, exclusivement intra-érythrocytaires, est que les stades parasitaires chez le moustique sont essentiellement extracellulaires. Cela pourrait changer leur sensibilité à certains composés car l'exposition ne se fait plus dans les mêmes conditions.

Notons que le mélange Tween80/EtOH n'a pas été testé comme véhicule pour délivrer les composés chez le moustique. En effet la toxicité du DMSO sur les souris infectées n'a été détectée que postérieurement à cette étude. N'ayant pas détecté de différences avec les contrôles dans ces expériences, nous n'avons pas reproduit les expériences avec le Tween80/EtOH.

Ingestion des composés par les moustiques

Les moustiques ingèrent directement les composés lorsque ceux-ci sont ajoutés à l'apport en sucrose habituel. Une preuve du bon fonctionnement du système est de trouver des fèces bleues chez le groupe ingérant du bleu de méthylène (figure 18).



Figure 18 : Preuve de l'ingestion des composés par la coloration bleue des fèces de moustiques lorsque ceux-ci sont nourris au bleu de méthylène.

Cependant, la toxicité de ces composés pour les moustiques est inconnue. Nous avons d'abord établi les seuils de toxicité du bleu de méthylène et du diméthylsulfoxyde (DMSO), véhicule du bMD1c.

Toxicité du bleu de méthylène et du DMSO pour les moustiques avant et après un repas sanguin infectieux

Dès leur émergence et jusqu'au repas sanguin infectieux soit 4 jours consécutifs, les moustiques ingèrent un des composés, bleu de méthylène ou DMSO. Les composés sont additionnés à différentes concentrations dans une solution de sucrose à 5%. Le taux de survie est mesuré 1 jour avant le repas sanguin et 1 jour après sur les mêmes groupes de moustiques (figure 19 A).

Le DMSO présente une toxicité croissante avec sa concentration et seul 50% des moustiques survivent avec 2.5% DMSO dans leur apport en sucrose avant le repas sanguin. La concentration 0.5% de DMSO est choisie pour la suite des expériences avec une survie de 70-90% (figure 19 B).

Nous n'avons pas détecté de toxicité pour le bleu de méthylène. La survie des moustiques ingérant du bleu de méthylène oscille entre 55 et 65% quelle que soit la concentration (de 0 à 2500 μ M). Ainsi pour la suite des expériences, la concentration de bleu de méthylène la plus élevée et non toxique, de 2500 μ M sera utilisée (figure 19 B).

La toxicité des composés a également été testée après un repas sanguin infectieux. Les moustiques reçoivent un repas sanguin 4 jours après leur émergence, puis les moustiques ingèrent un des composés, bleu de méthylène ou DMSO additionnés à différentes concentrations dans une solution de sucrose à 5%. Ce traitement est appliqué durant 7 jours consécutifs, jusqu'à la dissection des intestins des moustiques. Le taux de survie est mesuré 1 jour après le repas sanguin (figure 19 C).

Ici encore, au-delà de 2.5%, le DMSO est toxique pour les moustiques car seuls 66% d'entre eux survivent (figure 19 D). Le meilleur taux de survie des

moustiques est de 0.5% DMSO avec 88% de survie. Ce pourcentage de DMSO sera le pourcentage de véhicule utilisé pour la suite des expériences. Nous n'avons pas détecté de toxicité pour le bleu de méthylène. La survie des moustiques ingérant du bleu de méthylène oscille entre 92 et 100% quelle que soit la concentration (de 0 à 2500 μM). Ainsi pour la suite des expériences, la concentration de bleu de méthylène la plus élevée et non toxique, de 2500 μM sera utilisée (figure 19 D).

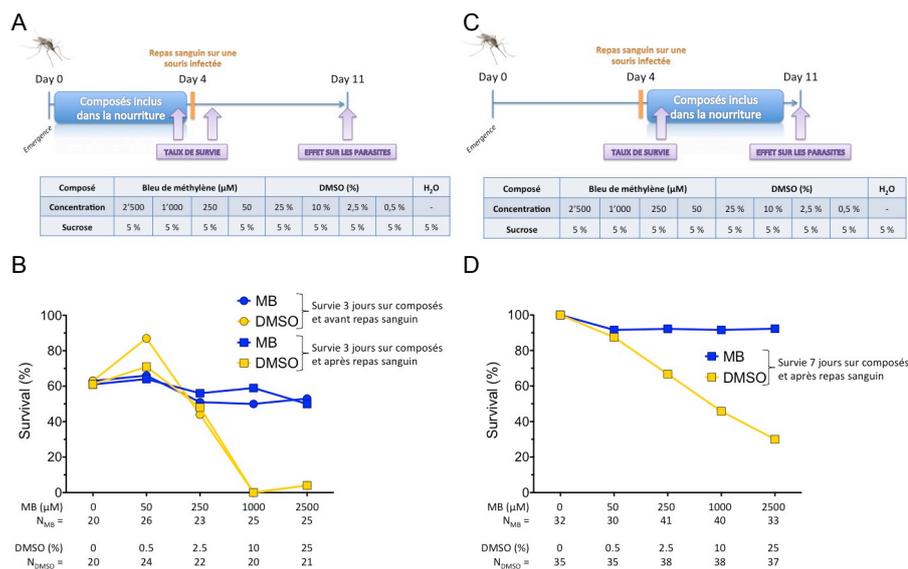


Figure 19 : Toxicité du DMSO et du bleu de méthylène sur les moustiques avant ou après un repas sanguin.

(A) Schéma expérimental. Les moustiques reçoivent dès leur émergence du bleu de méthylène (MB) ou du diméthylsulfoxyde (DMSO) avec l'apport en sucrose.

(B) Pourcentage de survie des moustiques recevant du DMSO ou du MB à différentes concentrations. Pour les mêmes moustiques, la survie est mesurée avant et après le repas sanguin infectieux.

(C) Schéma expérimental. Les moustiques reçoivent après un repas sanguin infectieux du bleu de méthylène (MB) ou du diméthylsulfoxyde (DMSO) avec l'apport en sucrose. (D) Pourcentage de survie des moustiques recevant du DMSO ou du MB à différentes concentrations. La survie est mesurée 24h après le repas sanguin infectieux. Ces expériences ont été menées une fois sur des moustiques sensibles (TS1).

Le bleu de méthylène ou bMD1c ingérés avant un repas sanguin n'ont pas d'effet ni sur la survie ni sur les parasites

Lorsque les moustiques ingèrent du bleu de méthylène ou du bMD1c aucun effet n'est observé, ni sur la prévalence ni sur la charge parasitaire. Les deux composés n'ont pas d'effet sur le parasite lorsqu'ils sont ingérés avant les parasites (figure 20 B).

L'effet est-il le même si les composés sont ingérés après le parasite ? Nous avons réalisé l'expérience d'ingestion des composés après un repas sanguin.

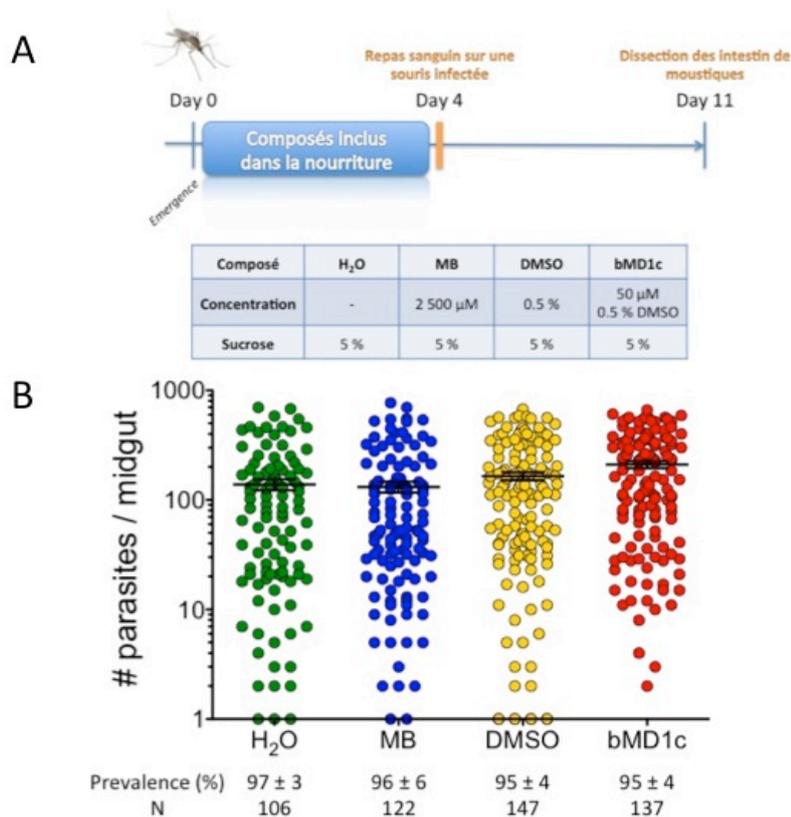


Figure 20 : Effet de l'ingestion du bMD1c ou du bleu de méthylène avant un repas sanguin infectieux.

(A) Schéma expérimental. Les moustiques reçoivent dès leur émergence soit de l'eau (H₂O), du bleu de méthylène (MB) à 2500 µM, du diméthylsulfoxyde (DMSO) à 0.5% ou du bMD1c à 50µM dans 0.5% DMSO ajouté à l'apport en sucrose. (B) Effet de l'ingestion du bleu de méthylène (MB), du diméthylsulfoxyde (DMSO) et du bMD1c avant un repas sanguin infectieux sur le niveau d'infection et la prévalence des parasites. Trois expériences indépendantes sur une souche de moustiques sensibles de lignée TS1.

Le bleu de méthylène ingéré après un repas sanguin n'a pas d'effets sur les parasites, bMD1c influence les moustiques TS1 uniquement

L'ingestion du bleu de méthylène après un repas sanguin infectieux n'a pas d'effet sur la charge parasitaire ou la prévalence sur les deux souches de moustiques testées (figure 21 B). En revanche, le bMD1c montre un effet variable d'une souche à l'autre (figure 21 B). En effet si dans la lignée G3L ni la prévalence, ni la charge parasitaire ne change par rapport au contrôle, dans la lignée TS1, ces deux paramètres sont plus bas que les contrôles à l'eau ou au DMSO.

Ainsi, la réduction de l'infection des moustiques par l'ingestion du bMD1c est liée à un facteur différent d'une lignée à l'autre. Les deux lignées sont élevées dans des pans différents et sont donc exposées à des flores bactériennes différentes. La réduction du nombre de moustiques infectés et de leur charge parasitaire serait due à un effet sur le microbiote intestinal plutôt que sur le parasite directement. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons cherché à « neutraliser » les flores intestinales des moustiques adultes en les traitant avec un cocktail d'antibiotiques dès leur émergence.

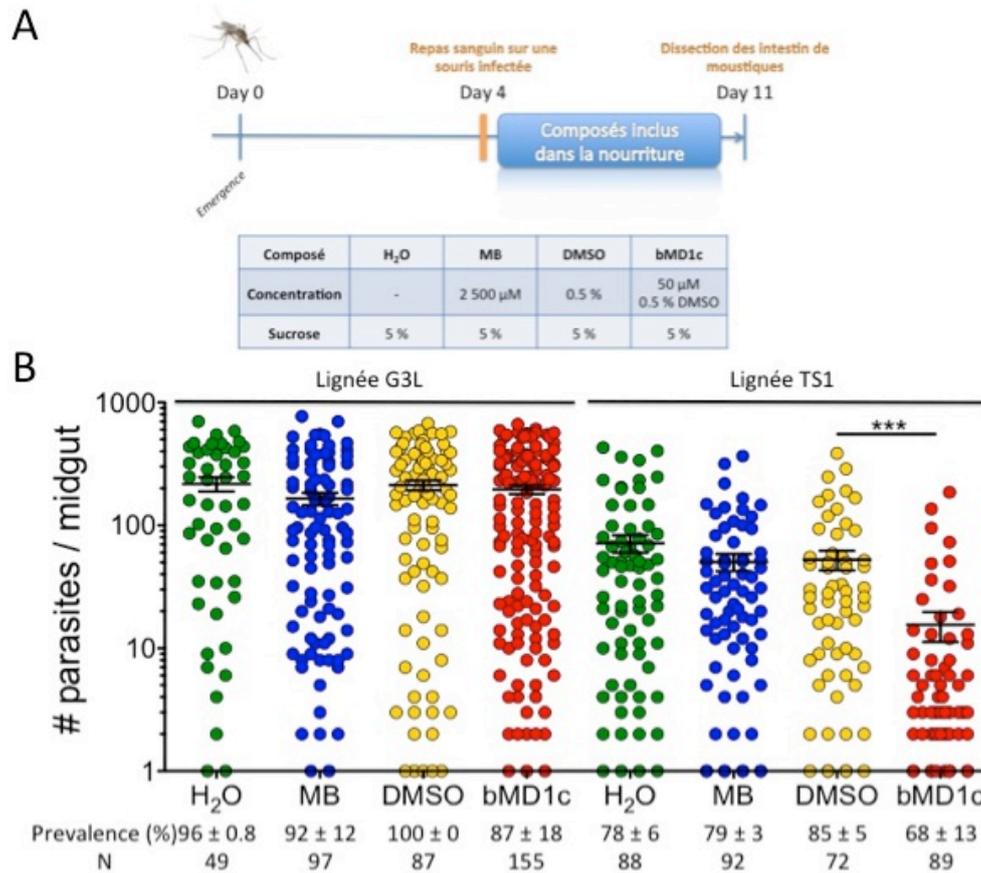


Figure 21 : Effet de l'ingestion du bMD1c ou du bleu de méthylène après un repas sanguin infectieux.

(A) Schéma expérimental. Les moustiques reçoivent après un repas sanguin infectieux soit de l'eau (H₂O), du bleu de méthylène (MB) à 2500 μM, du diméthylsulfoxyde (DMSO) à 0.5% ou du bMD1c à 50μM dans 0.5% DMSO ajouté à l'apport en sucrose. (B) Effet de l'ingestion du bleu de méthylène (MB), du diméthylsulfoxyde (DMSO) et du bMD1c après un repas sanguin infectieux sur le niveau d'infection et la prévalence des parasites. Deux expériences indépendantes sur des moustiques sensibles de deux lignées G3L et TS1.

L'effet du bMD1c sur les TS1 est perdu avec ou sans traitement antibiotique

La flore intestinale des moustiques peut influencer l'infection des moustiques et les rendre plus sensibles ou au contraire plus résistants aux parasites. L'ajout d'un cocktail d'antibiotiques dans l'apport en sucrose dès l'émergence des adultes permet d'éliminer la majorité de la flore intestinale.

Les moustiques TS1 et G3L sont exposés au cocktail d'antibiotiques de leur émergence jusqu'au repas sanguin (4 jours), puis reçoivent l'un des composés ou un contrôle mélangés au sucrose (figure 22 A). Une première observation est que le traitement aux antibiotiques ne change ni la charge parasitaire ni la prévalence (figure 22 B). Cependant, d'après la littérature, des moustiques traités aux antibiotiques présentent des taux d'infection plus importants (Blumberg, Trop, Das, & Dimopoulos, 2013). Une deuxième observation est que la réduction de l'infection des TS1 traités avec bMD1c n'est pas reproduite avec ou sans antibiotiques. Il est donc impossible de conclure ici sur l'effet du bMD1c sur la flore du moustique.

Par ailleurs, les moustiques élevés à l'IBMC ont une flore intestinale très complexe, constituée de dizaines de bactéries de genres différents contrairement aux moustiques d'autres laboratoires essentiellement porteurs de bactéries du genre *Elizabethkingia sp.* (98% de la flore de l'intestin) (Kukutla et al., 2014). Cette complexité peut également expliquer qu'un effet n'apparaisse que dans certaines conditions et pour certaines lignées.

Nous n'avons pas constaté d'effet sur les parasites ni du bMD1c ni du bleu de méthylène par prise orale. Après ingestion par le moustique, les parasites motiles traversent rapidement les couches épithéliales de l'intestin pour se retrouver côté basal, en contact avec l'hémolymphe. Une autre façon d'exposer les parasites aux composés serait de les introduire directement dans l'hémolymphe par microinjection.

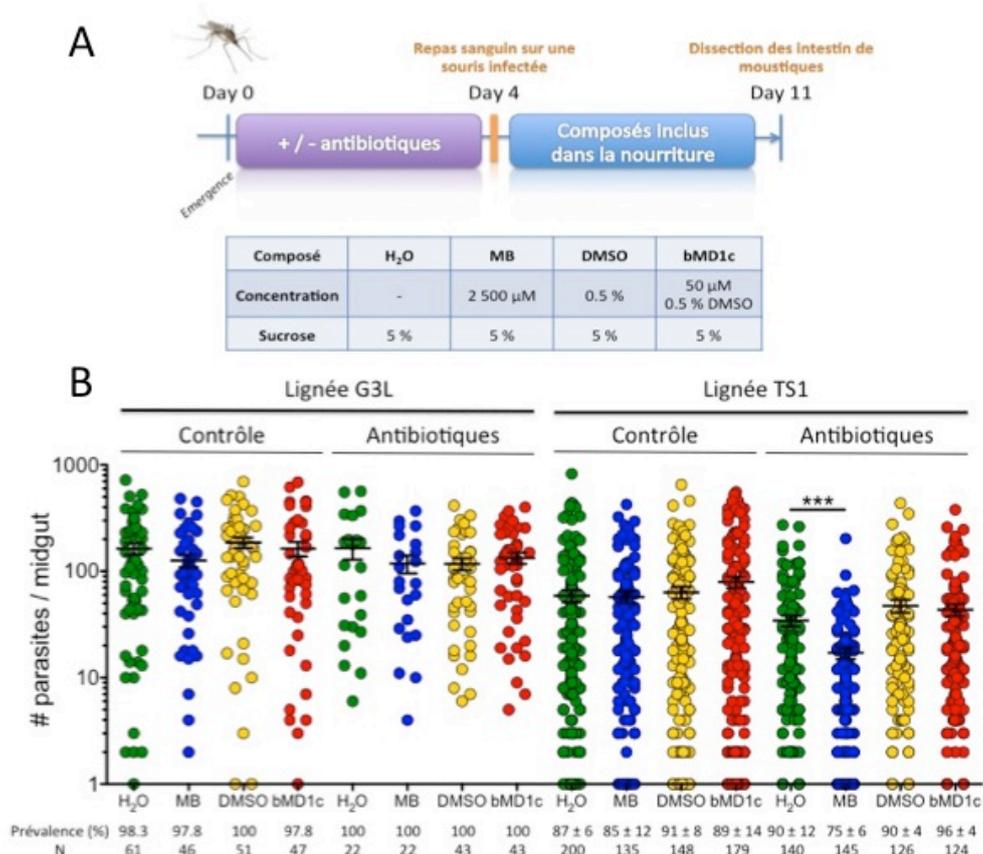


Figure 22 : Effet de l'ingestion du bMD1c ou du bleu de méthylène sur les moustiques G3L et TS1 +/- traités aux antibiotiques et après un repas sanguin infectieux.

(A) Schéma expérimental. Les moustiques reçoivent dès leur émergence et jusqu'au repas sanguin infectieux (4 jours) soit de l'eau sucrée soit un cocktail d'antibiotiques ajouté à l'apport en sucrose. Après un repas sanguin infectieux, ils reçoivent soit de l'eau (H₂O), du bleu de méthylène (MB) à 2500 μ M, du diméthylsulfoxyde (DMSO) à 0.5% ou du bMD1c à 50 μ M dans 0.5% DMSO ajouté à l'apport en sucrose. (B) Effet de l'ingestion du bleu de méthylène (MB), du diméthylsulfoxyde (DMSO) et du bMD1c après un traitement préalable aux antibiotiques et un repas sanguin infectieux sur le niveau d'infection et la prévalence des parasites. L'expérience a été menée 1 fois pour la lignée G3L et 4 fois pour la lignée TS1.

Injection des composés dans les moustiques

Temps minimum entre l'injection et le repas sanguin

Le modèle de micro-injection utilisé au laboratoire est basé sur une injection des moustiques avec du dsRNA 3 jours avant un repas sanguin infectieux. Nous avons testé l'injection de moustiques dans des temps les plus proches possible du repas sanguin afin d'optimiser la possibilité de détecter un effet des composés sur le développement des parasites. Nous avons cherché à savoir quel serait le temps le plus court entre injection et infection sans influencer leur taux de survie ni leur faculté à se gorger. À l'inverse, les oocinètes sont formés dans l'intestin à partir de 18h après l'ingestion des parasites, puis ils traversent l'épithélium et se retrouvent du côté basal de l'intestin. Ainsi, nous avons également testé l'injection des composés le plus rapidement possible après le repas sanguin afin d'exposer les parasites dès leur traversée de l'intestin.

Différents groupes d'anophèle femelles ont donc été injectés 72, 48, 24 et 6h avant de se voir proposer un repas sanguin. En parallèle d'autres femelles sont injectées à 18, 24, 48 et 72h après leur repas sanguin (figure 23). Le taux de survie des femelles est mesuré 7 jours après le repas sanguin.

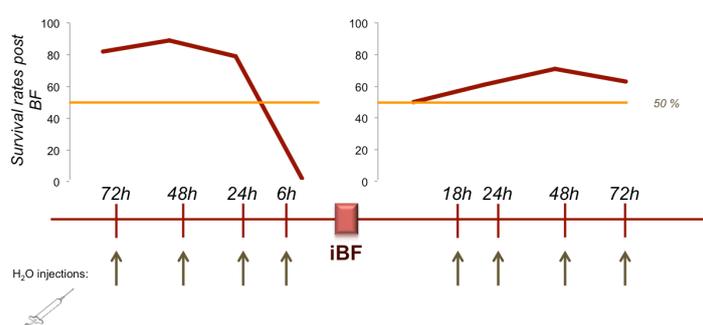


Figure 23 : Pourcentage de survie des moustiques recevant des injections d'H₂O à différents instants avant ou après un repas sanguin. Expérience menée 1 fois.

Pour les femelles ayant reçues une injection d'eau 48 et 72h avant le repas sanguin survivent à 90 et 80% respectivement. Celles injectées 24h avant le repas sanguin ont un taux de survie de 75% et se nourrissent normalement. Les

femelles ayant reçus une injection d'eau 6h avant le repas sanguin ont un taux de survie de moins 5%, cette durée réduit beaucoup trop la survie pour être utile. Les moustiques injectés 18h après repas sanguin, meurent à 50%, ils sont encore trop fragilisés de s'être gorgés pour être infectés. En revanche, les femelles injectées 24, 48 et 72h après s'être gorgées survivent à 70-80%. La durée la plus proche séparant l'injection des femelles et leur repas sanguin sans perturber leur survie est donc de 24h avant le repas sanguin ou 24h après.

L'injection du bleu de méthylène ou de bMD1c 24h avant ou après un repas sanguin infectieux ne change pas l'infection des moustiques

Les concentrations optimales à injecter avaient été testées au préalable par Ondra Hajdusek, post doctorant au laboratoire. Différents groupes de femelles anophèles ont été injectées avec les composés 24h avant de recevoir un repas sanguin infectieux. Cette expérience n'a été menée qu'une fois sur de petits groupes de moustiques mais aucun phénotype ni sur la prévalence ni sur la charge parasitaire n'a été observé (figure 24 A). Nous avons également essayé d'inverser le protocole en injectant les moustiques 1, 2, 3 et 4 jours après le repas sanguin. Cette fois encore aucun phénotype ni sur la prévalence ni sur la charge parasitaire n'a été observé pour aucun des jours d'injection ni pour le bleu de méthylène ni pour le bMD1c (figure 24 B).

Même si les composés sont en contact dans l'hémolymphe avec les parasites ayant traversé la membrane épithéliale de l'intestin, cela n'est pas suffisant pour leur permettre de tuer les parasites dans le moustique.

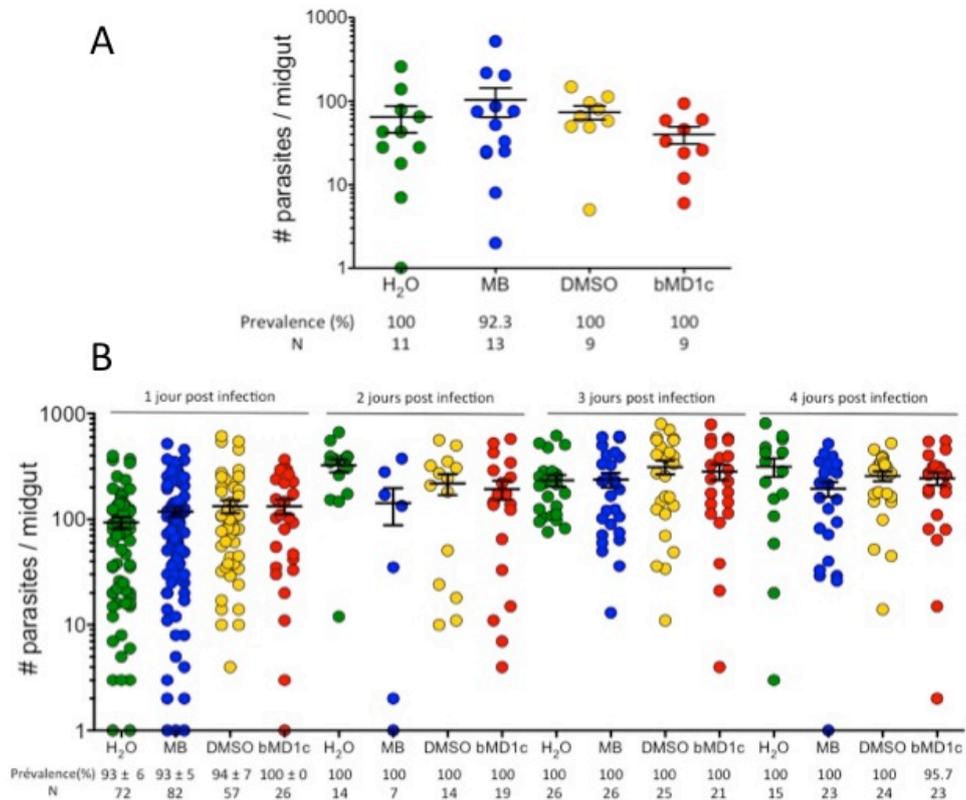


Figure 24 : Effet de l'injection du bMD1c ou du bleu de méthylène avant ou après un repas sanguin infectieux.

(A) Effet de l'injection du bleu de méthylène (MB) à 1mM, du diméthylsulfoxyde (DMSO) à 10% et du bMD1c à 1mM à 10% DMSO 24h avant un repas sanguin infectieux. (B) Effet de l'injection du bleu de méthylène (MB), du diméthylsulfoxyde (DMSO) et du bMD1c 24, 48, 72 et 96h après un repas sanguin infectieux. Les expériences ont été menées 3 fois 24h après le repas sanguin et 1 fois pour le reste toutes sur la lignée G3L.

Conclusions et perspectives du chapitre 1

Partie I – Mise en place d’un modèle de transmission *in vivo*

Nous avons optimisé le protocole pour tester la capacité de nouveaux antipaludiques à bloquer la transmission, notamment le composé 1o. Les points essentiels pour l’optimisation ont été le type de passage, le temps entre le passage et la première injection de composés et le temps entre les injections d’anesthésiques et de composés. Le tableau ci-dessous récapitule les différents paramètres qui ont été optimisés pour établir un modèle infection *in vivo* robuste.

Lignée de souris	CD1
Type de passage	i.v. d’une souris donneuse à 3%
Moment de la 1 ^{ère} injection de composé	1 jour post passage
Véhicule des composés	10% de Tween80/EtOH (70%/30%) dans H ₂ O
Durée entre les injections d’anesthésique et de composés	12h

Figure 25 : Tableau récapitulatif des paramètres optimiser pour l’établissement du modèle *in vivo*.

Partie II – Le potentiel des arylméthylamino stéroïdes comme nouvel antipaludique

Le composé 1o a montré un très fort potentiel antipaludique en tant que composé leader. C'est un composé aussi efficace que l'artémisinine sur les parasites asexués et il bloque complètement la transmission du parasite aux moustiques *in vivo* avec seulement 3 injections. Cette activité serait due à son action sur les stades asexués doublée d'un effet sur les gamétocytes.

Un problème qui pourrait être soulevé pour un développement plus poussé est la réaction hormonale que pourrait potentiellement engendrer ce composé s'il est métabolisé dans les gonades. L'ajout d'une fonction azotée basique est en cours afin de réduire la réactivité hormonale de la molécule.

Le but de mon travail avec la molécule 1o a été de caractériser son action sur la transmission du parasite sans inclure l'étude de son mode d'action. Celle-ci a été réalisée par l'équipe du Professeur Katja Becker à Giessen.

Ce travail a été inclus dans le manuscrit de nos collaborateurs et publié dans le journal Nature Communications (Wittlin et al., 2017).

Partie III – Ingestion et injection du bleu de méthylène et du bMD1c dans le moustique

L'ingestion et l'injection du bleu de méthylène ou du bMD1c ne sont pas délétères pour la survie des moustiques aux concentrations testées. J'ai également pu observer que lorsque ces deux composés sont ingérés ou injectés dans le moustique, ils ne sont pas actifs *in vivo* sur les stades sexués du parasite chez le moustique. Pour le bleu de méthylène, l'absence d'effet sur le parasite lors d'une injection ou de l'ingestion par le moustique est surprenante au vu de son efficacité lorsqu'il est injecté *in vivo* chez la souris.

Plusieurs raisons peuvent expliquer l'absence d'effet des deux composés. D'abord par une absence d'activité sur le parasite : (i) car celui-ci est alors

extracellulaire ; (ii) un effet limité sur la flore intestinale de nos moustiques (même si la flore intestinale des moustiques est modifiée par la prise de composés, aucun changement ne s'effectue sur le développement des parasites) ; (iii) une faible biodisponibilité, hypothèse peu probable pour le bleu de méthylène qui est soluble dans l'eau mais ne montre pas d'effet sur le développement du parasite.

Ensuite par une absence d'activité sur le moustique : (i) la faible biodisponibilité du bMD1c (probablement pas le cas pour le bleu de méthylène qui n'affecte pas non plus la survie du moustique); (ii) le moustique ne possède pas nécessairement la flavoenzyme ciblée par le bMD1c (en particulier, le moustique ne possède pas de GR), (iii) dans le globule rouge infecté, la présence de metHb est requise pour permettre l'oxydation du bMD1c afin de perpétuer le cycle subversif du composé, or il n'y a pas nécessairement de composé oxydé qui puisse interagir avec le bMD1c dans les cellules du moustique, (iv) le MB est n'a pas d'effet délétère chez l'homme et la souris, il est possible que le MB soit également inoffensif dans un autre organisme pluricellulaire tel que le moustique.

Notons deux points concernant les infections des moustiques nourris avec les composés :

- la perte du phénotype observé dans un premier temps avec les moustiques TS1 dont la charge parasitaire était réduite lorsque les moustiques ingéraient du bMD1c par rapport au contrôle DMSO (répétées 3 fois). Lorsque ces expériences ont été reproduites plusieurs mois plus tard, nous n'avons pas retrouvé cette différence. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées : (1) une modification du microbiote des moustiques entre les deux séries d'expériences, avec un effet potentiel du bMD1c sur certaines bactéries, et/ou (2) une dérive génétique de la population et un effet du bMD1c sur le moustique directement dans ce cas (moins probable).
- L'absence d'augmentation de la charge parasitaire dans les moustiques traités aux antibiotiques comparés aux contrôles non traités. En effet, plusieurs publications font état de cette différence (Boissière et al., 2012;

Dong et al., 2009). Là encore, nous pouvons faire plusieurs hypothèses : (1) nous n'avons pas vérifié l'efficacité du cocktail d'antibiotiques à diminuer la quantité de bactéries présentes dans les intestins des moustiques traités, (2) ces antibiotiques sont à large spectre mais n'éliminent pas toutes les bactéries, aussi, celles qui affectent directement ou indirectement le nombre de parasites n'ont peut être pas été éliminées, (3) les microbiotes des moustiques dans différents laboratoires ne sont pas les mêmes, avec des populations bactériennes plus ou moins complexes, ce qui peut aussi en partie expliquer ces différences. Nous n'avons cherché à approfondir la question puisque nous avons perdu la différence de charge parasitaire entre les moustiques traités au bMD1c et leur contrôles DMSO en condition sans antibiotiques.

Au vu de l'absence d'effet significatif et reproductible lors de l'injection ou de l'ingestion du bleu de méthylène ou de la molécule bMD1c, nous n'avons pas poursuivi ces expériences..

CHAPITRE 2 :

LES BENZYL-MENADIONES, DES MOLECULES

CIBLANT LES STADES SEXUES DU PARASITE ET

REDUISANT LA TRANSMISSION

Introduction du chapitre 2

Objectif de ce chapitre

Le but de ce chapitre est de caractériser la capacité de la benzylménadione 1c appelée plasmodione (bMD1c) et ses dérivés à (i) réduire la parasitémie *in vivo* et (ii) à bloquer la transmission du parasite aux moustiques. Pour cela, les bMDs ont été testées contre les deux espèces *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium berghei*. *P. berghei* a permis d'étudier l'action *in vivo* du composé sur les stades asexués du parasite dans un premier temps, puis sur la transmission du parasite de la souris au moustique et sur les différents stades infectieux du parasite pour le moustique. Afin de caractériser l'efficacité des bMDs sur les stades asexués de *P. falciparum*, dont le développement est différent de *P. berghei*, nous avons également mesuré l'action du bMD1c sur les gamétocytes de *P. falciparum in vitro*.

Ainsi nous avons essayé de caractériser le plus précisément possible l'action du bMD1c en parallèle de deux molécules dérivées, sur la transmission à la fois *in vitro* et *in vivo*.

Quelques informations sur le bMD1c

Le bMD1c est le composé tête de série, issu de la conception et du criblage de dérivés ménadiones (MDs) visant à inhiber les enzymes glutathion réductase (GR) chez le globule rouge parasité par *P. falciparum*. Des études précédentes ont pu montrer que le bMD1c agit comme *redox cycler* sur le parasite et engendre sa mort par la perturbation de son équilibre redox. Cette stratégie est reconnue et soutenue pour le développement de nouveaux antipaludiques (Jortzik & Becker, 2012b; Müller et al., 2011)

De plus, le bMD1c élimine rapidement les parasites *P. falciparum in vitro*, notamment sur les stades anneaux. Il ne semble pas induire de résistance génétique lorsqu'une pression de sélection avec bMD1c est imposée pendant plusieurs semaines avec le bMD1c à des parasites mutant facilement. Des études de combinaison *in vitro* avec d'autres antipaludiques, montrent que le bMD1c

peut être utilisé en combinaison avec d'autres antipaludiques. Enfin, le bMD1c présente une cytotoxicité très modérée vis-à-vis des cellules humaines à 1000 fois la dose d'IC₅₀, ce qui présage d'un très bon index thérapeutique (Ehrhardt et al., 2016).

Cibler la réduction à la fois des symptômes et de la transmission

Pour viser le contrôle, voire l'éradication du paludisme, le parasite doit être frappé sur deux fronts : (i) non seulement de soigner les patients en réduisant les symptômes cliniques mais aussi de (ii) limiter ou bloquer la transmission (N J White et al., 2013).

La réduction des symptômes cliniques passe par l'élimination des stades érythrocytaires du parasite grâce à l'administration d'antipaludiques appropriés. En revanche, l'élimination des stades sexués est plus difficile. Les gamétocytes persistent pendant 2-3 semaines après l'élimination des stades asexués (Alano, 2007; Talman et al., 2004). Comme les stades sexués n'induisent aucun symptôme, il est difficile de détecter une personne porteuse de gamétocytes et donc de la traiter. Une personne guérie après traitement peut encore être infectieuse pour les moustiques et contribuer à la dissémination du parasite. Aussi est-il essentiel de trouver de nouveaux traitements qui permettent non seulement de soigner les gens, mais aussi d'éliminer les gamétocytes. Pour ces raisons, le développement des composés susceptibles de réduire la transmission du parasite au moustique est favorisé par les organisations non gouvernementales telles que l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) ou le bailleur de fonds *Medicines for Malaria Ventures* (MMV). Plusieurs stratégies sont possibles afin de réduire/bloquer la transmission : (i) le développement de nouveaux antipaludiques capables à la fois de guérir les patients et d'agir sur les gamétocytes, (ii) la réduction des populations de moustiques (par des insecticides, moustiques transgéniques ou infectés par la bactérie *Wolbachia*), et (iii) la réduction des contacts moustique/homme afin de diminuer l'exposition aux piqûres (moustiquaires).

Évaluation du blocage de la transmission par la série chimique des bMDs

La capacité d'un composé à bloquer la transmission peut être mesurée par une batterie de tests cités dans l'introduction générale. Le bMD1c a montré son potentiel antipaludique en conditions *in vitro* contre les stades asexués de *P. falciparum* (Ehrhardt et al., 2016; Müller et al., 2011). Le but de notre projet est de (i) tester son comportement *in vivo* sur la parasitémie ainsi que (ii) sa capacité à bloquer la transmission du parasite au moustique.

Le composé leader, le bMD1c, s'est montré lors du premier test de Peters *in vivo* d'une efficacité moyenne (Müller et al., 2011). L'hypothèse de cette chute d'efficacité est que le composé est peu biodisponible. Les raisons pouvant expliquer la faible biodisponibilité du composé sont les suivantes : (i) le manque de solubilité du composé : le bMD1c est très peu soluble (figure 26) ; (ii) l'adsorption sur les protéines du sérum : le bMD1c est fortement adsorbée sur les protéines sériques ; (iii) un métabolisme rapide dû à une réactivité importante ; (iv) une élimination rapide par les reins ou le foie ; (v) le bMD1c n'est pas active sur *P. berghei*.

Composé	Solubilité	Influence du sérum sur l'IC ₅₀ chez la souche NF54 (nM)	
		0.5% albumax	50% sérum humain
Ato*	0 µM	N.D.	N.D.
bMD1c**	0,44 ± 0,05 µM	57	270
bMD30**	0,06 ± 0,01 µM	93	80
bMD40**	3,7 ± 0,7 µM	N.D.	N.D.

Figure 26 : Tableau regroupant quelques caractéristiques des composés bMDs et d'antipaludiques de référence. Les solubilités thermodynamiques ont été calculées à partir des données du fournisseur Sigma. Plus la solubilité est proche de 0, plus le composé est insoluble. * conditions : PBS – 1% DMSO ; ** conditions : PBS – 10% DMSO

Les tests de déplacement des valeurs d'IC₅₀ en présence de sérum ont été réalisés au Swiss Tropical and Public Health Institute (Bâle – Suisse).

Nous avons testé en parallèle deux molécules de la famille des bMDs pouvant répondre à certaines de ces limitations. La première molécule, la bMD30, a été sélectionnée lors du test d'influence du sérum sur l'IC₅₀ chez la souche NF54 réalisé au *Swiss Tropical and Public Health Institute* à Bâle, Suisse. Ce test vise à mesurer l'impact des protéines du sérum sur l'efficacité d'une molécule. L'IC₅₀ du composé est mesuré *in vitro* sur *P. falciparum* en parallèle dans les mêmes conditions, sauf qu'une plaque contient du sérum complet alors que l'autre est complétée avec de l'albumine de sérum bovin (BSA), utilisée couramment pour remplacer le sérum. Si l'IC₅₀ est multipliée par 5 en présence de sérum complet pour bMD1c, l'IC₅₀ de bMD30 est la même avec ou sans sérum et similaire à celle de bMD1c. Cela suggère que le bMD1c est adsorbée sur les protéines sériques contrairement à la bMD30 (figure 26). La bMD30 possède un atome de fluor supplémentaire sur le cycle aromatique du squelette ménadione par rapport à bMD1c qui lui permettrait d'être beaucoup moins adsorbé par les protéines du sérum humain. Si la faible biodisponibilité du bMD1c est liée à l'adsorption sur les protéines sérique (ii), la bMD30 serait plus active que bMD1c.

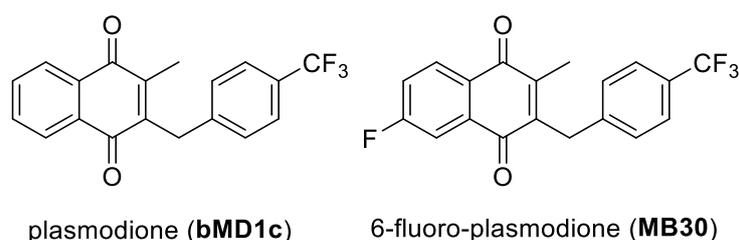


Figure 27 : Structure chimique (A) du bMD1C et (B) du bMD30

La seconde molécule dérivée de bMD1c, est le bMD40. Ce dérivé de bMD1c comporte un groupement solubilisant, qui lui accorde plus de solubilité que bMD1c et le protège des attaques nucléophiles. Il est aussi supposé plus biodisponible que bMD1c. La molécule n'est pas représentée ici pour de raisons de confidentialité, une demande de brevet étant en cours. Le bMD40 est 10x plus soluble que le bMD1c. Si la faible biodisponibilité est due à la faible solubilité (hypothèse (i)), la bMD40 serait plus active que bMD1c (figure 26). De plus,

l'introduction du groupement solubilisant pourrait prévenir la destruction de la molécule en bloquant son métabolisme chez l'hôte ou le parasite (hypothèse (iii)) et prévenir l'élimination précoce de la molécule.

Pour l'évaluation de la capacité à stopper la transmission de ces molécules, nous avons choisi de travailler avec le modèle d'infection *P. berghei*, car l'évaluation du blocage de la transmission ne peut pas se faire sur l'homme. De plus, ces molécules ne sont pas encore au stade d'être testées chez l'homme. C'est pourquoi, nous avons choisi de travailler avec les deux espèces de parasites, *P. falciparum* et *P. berghei*. Ce choix nous a permis de tester les molécules *in vitro* contre le parasite humain mais aussi de les tester *in vivo*, contre le parasite murin, couvrant leur spectre d'action chez l'hôte vertébré aussi largement que possible.

Les modèles murins de Plasmodium

Plasmodium berghei est le parasite du paludisme chez les rongeurs. Il a été découvert en Afrique de l'Ouest (Killick-Kendrick, R., 1978). Il est aujourd'hui un modèle largement utilisé à travers le monde car son génome est facilement manipulable et il produit une grande quantité de gamétocytes. *P. berghei* appartient au groupe de *Plasmodium* infectant les rongeurs avec *P. vinckei*, *P. chabaudi* et *P. yoelii*. Ces parasites de différentes espèces ont tous été isolés soit dans un rongeur soit dans un moustique du genre *Anopheles*. *P. berghei* a été découvert pour la première fois par Vincke et Lips en 1948 au Zaïre (actuelle République Démocratique du Congo) puis isolé à partir de trois espèces différentes de rongeurs (Leiden Malaria Research group website – LUMC University).

Quatre espèces de Plasmodium murins

Les quatre espèces de parasites murins décrites ici sont essentiellement des parasites naturels des rongeurs du genre *Thamnomys* (figure 28). En laboratoire, *P. berghei* et *P. yoelii* sont capables d'infecter des souris, des rats mais aussi des

hamsters, alors que *P. vinckei* et *P. chabaudi* possèdent un plus petit spectre d'hôtes.



Figure 28 : *Grammomys surdaster*, un des hôtes naturels de *P. berghei*

Un seul vecteur naturel de *P. berghei* et *P. vinckei* a été identifié comme étant *Anopheles durenii millecampsi*. L'infectiosité des *Plasmodia* murins pour leurs vecteurs anophèles est beaucoup plus faible que pour leurs hôtes vertébrés. Si beaucoup de lignées d'Anophèles sont réfractaires, *Anopheles stephensi* et *Anopheles gambiae* sont infectés par *P. berghei*.

Il existe des différences entre les *Plasmodium* murins, elles sont essentiellement des différences de morphologie, de taille des parasites au même stade, de temps de développement ou de métabolisme enzymatique (figure 29). Ces différences définissent les interactions hôte-pathogène, la virulence et la pathologie. On peut citer en exemple, la température optimale de développement chez le moustique (21°C pour *P. berghei* et 24°C pour *P. yoelii*). Un autre exemple est l'invasion préférentielle d'une population d'érythrocytes. *P. chabaudi* et *P. vinckei* envahissent des érythrocytes matures et immatures de manière indifférente alors que *P. berghei* et *P. yoelii* envahissent préférentiellement les érythrocytes immatures (réticulocytes) (Carter et al., 1977 ; Killick-Kendrick, R., 1978 ; Landau et al., 1978 ; Landau et al., 1994).

	<i>P berghei</i>	<i>P yoelii</i>	<i>P chabaudi</i>	<i>P vinckei</i>	Human parasites
Merozoïtes par Schizont	12-18	12-18	6-8	6-12	8-16
Préférence pour les réticulocytes	Yes	Yes	No	No	Yes/No
Infection synchrone dans le sang	No	No	Yes	Yes	Yes/No
Température optimale pour la transmission aux moustiques (°C)	19-21	23-26	24-26	24-26	> 26
Taille des ookystes (um)	< 45	60-75	50	45-54	50-60
Sporozoïtes dans les glandes (jours post infection)	13-14	9-11	11-13	10-13	Dépendant de la température
Diamètre moyen des schizonts pré-érythrocytaires	27	35-50	38-45	35	45-60
Durée du cycle pré-érythrocytaire (heures)	48-52	43-48	50-58	60-72	6-15 jours
Durée du cycle asexué (heures)	22-24	18	24	24	24-72
Durée de la gamétogénèse (heures)	26-30	27	36?	27	48h-12jours
Durée du développement des oocinètes (heures)	18-24	18-24	10-24?	18-24?	12-24
Taille des microgamètes (um)	15	16	-	-	16-25
Taille des sporozoïtes (um)	11-12	14-16	10-15	11-21	10-14
Taille des oocinètes	10-12	11	-	8-10	11-20

Figure 29 : Principales caractéristiques entre les quatre espèces de *Plasmodium* murins et les *Plasmodium* humains

(Inspiré de Leiden Malaria Research group website – LUMC University).

L'invasion préférentielle des réticulocytes

P. berghei envahit préférentiellement les réticulocytes que les normocytes (érythrocytes matures). La majorité des lignées *PbANKA* ont une forte préférence pour les réticulocytes, mais lorsque la population de réticulocytes (\approx 2% des érythrocytes circulants) est entièrement colonisée, ces parasites ont la capacité de changer et d'envahir les normocytes. Dans les normocytes, *P. berghei* produit moins de gamétocytes, moins de mérozoïtes qui sont également moins fonctionnels. Lorsque des réticulocytes sont à nouveau disponibles, le parasite change et revient à l'invasion préférentielle des réticulocytes. Ainsi, le cours de l'infection d'une souris par *P. berghei* passe par une première phase d'invasion des réticulocytes uniquement (avec parasitémie inférieure à 2 %). Puis le changement des parasites pour l'invasion des normocytes, fait évoluer la

parasitémie à 15-25% en quelques jours (voir plus bas pour le développement asexué de *P. berghei*). Dans ces conditions, la souris décède soit de neuro-paludisme soit d'anémie résultant de la trop haute parasitémie.

À noter que, chez *P. berghei* la gamétoctogénèse n'est possible que dans les réticulocytes des souris. Si un composé bloque la transmission dans le modèle murin, il est important de s'assurer que l'effet observé est direct (en éliminant les parasites) et non indirect par une diminution des réticulocytes et donc de la parasitémie et de la gamétoctogénèse (Chris Janse, Leiden Malaria Research group website – LUMC University).

Virulence et pathologie

Une infection par *P. berghei* entraîne la mort du rongeur dans les une à trois semaines suivant l'infection. De nombreuses lignées de rongeurs développent une forme de neuro-paludisme (souris C57BL/6), i.e. un coma lié à l'infection et cause principale de leur décès, alors que d'autres ne développent pas ces symptômes mais meurent d'anémie due à une parasitémie très forte (souris CD1). L'infection de rongeurs de laboratoire par *P. berghei* est fatale car ils ne sont pas l'hôte naturel du parasite et n'ont pas développé de résistance comme l'hôte naturel, qui ne développe qu'une infection chronique.

La virulence est aussi déterminée par la voie d'infection et l'inoculum (la dose de parasites injectés). La virulence du parasite sera différente si l'infection se fait par piqûre de moustique (injection de sporozoïtes) ou par passage sanguin par injection péritonéale (i.p.) ou intraveineuse (i.v.) (Carter et al., 1977 ; Killick-Kendrick, R., 1978 ; Landau et al., 1978 ; Landau et al., 1994).

Développement asexué et sexué du parasite Plasmodium berghei

Le cycle de vie de *P. berghei* est de 24h au lieu de 48h pour *P. falciparum*. L'invasion du réticulocyte par le mérozoïte conduit à la formation du stade anneau (0-16h) puis trophozoïte et schizonte (16-24h). Le nombre de mérozoïtes produits est plus important (16-18) si le parasite a envahit un réticulocyte plutôt qu'un normocyte (seulement 8-12 mérozoïtes produits). Le cycle intra-érythrocytaire n'est pas fortement synchronisé chez *P. berghei*. Pour chaque cycle asexué, 5 à 25% des parasites *PbANKA* s'engagent dans la voie de la

différenciation sexuée et deviennent des gamétocytes. Ces cellules haploïdes que sont les macrogamètes (gamétocytes mâles) et microgamètes (gamétocytes femelles) sont les précurseurs des gamètes dans le moustique. Une particularité de *P. berghei*, est que les schizontes hépatiques sont également capables de former des gamétocytes, en plus des stades asexués. Les facteurs faisant s'engager certains parasites dans la voie de la différenciation sexuée sont encore méconnus. Chez *P. berghei* la différenciation serait induite durant le stade trophozoïte, contrairement à *P. falciparum* après une deuxième réinvasion. La maturation des gamétocytes à partir de la réinvasion est beaucoup plus rapide que chez *P. berghei* : seulement 26 à 30 heures. Durant les premières 16-18h, le gamétocyte est indifférenciable d'un parasite asexué. Le gamétocyte adopte ensuite les caractéristiques spécifiques des stades sexués et se différencie selon son sexe. Les mécanismes d'infection des intestins de moustiques sont très similaires à ceux impliqués avec *P. falciparum*, déjà détaillés dans l'introduction générale, et qui ne sont pas décrits ici. Je tiens seulement à préciser les trois facteurs déclencheurs de la différenciation des gamétocytes en gamètes que sont (i) la chute de la température de 5°C en dessous de la température de l'hôte vertébré, (ii) l'augmentation du pH de 7.3 dans le sang à 8 dans l'intestin de moustique et (iii) la présence d'acide xanthurénique dans l'intestin. La fertilisation des gamètes se fait en 1h pour former un zygote qui évolue en oocinète en 24h. De façon très similaire à *P. falciparum*, l'invasion des cellules épithéliales et la formation d'ookystes prend 10-13 jours chez *P. berghei* et les premiers sporozoïtes apparaissent dans les glandes salivaires 14 jours après le repas sanguin infectieux (Chris Janse, Leiden Malaria Research group website – LUMC University).

Les stades sexués, seuls à être infectieux pour le moustique, sont au cœur de ce chapitre. L'effet des molécules bMDs et les antipaludiques de référence sur ces stades est un point clé de ce projet.

Matériel et méthode du chapitre 2

Élevage des moustiques

Les moustiques *Anopheles gambiae* de souche G3 sont élevés à l'IBMC selon la procédure décrite dans la publication (Richman et al., 1997).

Élevage des souris

L'élevage et les expérimentations animales décrites dans cette partie, ont été réalisées à l'Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire (Strasbourg, France) dans des installations et selon des protocoles approuvés par la législation française pour le bien être animal. Le projet (04480.02) et le bâtiment (numéro d'agrément de l'institut F674822) ont été approuvés par les autorités françaises.

Passage du parasite Plasmodium berghei

Les souris CD1 sont infectées par le parasite *Plasmodium berhei* de la souche ANKA est exprimant de façon constitutive la GFP (Green Fluorescent Protéine) ou la GFP-luciférase. Pour passer le parasite d'une souris à l'autre, une ponction cardiaque est réalisée sur une souris donneuse avec une parasitémie entre 3-5%. Le sang collecté est dilué dans du PBS fin d'obtenir une concentration de 10^8 érythrocytes infectés/mL. 0.2mL de ce mélange sont injectés à une souris donneuse par voie intravéneuse. La parasitémie de la souris est suivi par cytométrie (FACSCalibur™, BD Bioscience) ou par frottis sanguin coloré au Giemsa.

Capacité d'un composé à bloquer la transmission in vivo

Les composés bMD1c et bMD40 sont resuspendus dans une solution de tween80/éthanol absolu (7 :3) puis soniqué pendant 5 à 8min. Cette est suivie d'une dilution 10x dans l'eau afin d'atteindre la concentration finale de 30mg/mL. Le ProveBlue est une solution commerciale de bleu de méthylène ne contenant aucun métal lourd (5mg/mL) et a été choisi comme contrôle positif. Les solutions sont injectées quotidiennement (24h, 48h et 72h post passage) par

voie intra péritonéale (i.p.) à une dose de 30mg/kg et 15mg/kg respectivement. Le contrôle négatif est un groupe de souris injectées en i.p. avec une quantité équivalente de véhicule des composés. Les injections de composés sont réalisées le soir (6-8 p.m.).

La parasitémie des souris est mesurée quotidiennement par cytométrie (FACSCalibur™, BD Bioscience). En parallèle, des groupes de 40 femelles *Anopheles gambiae* (adultes de 4-7 jours) prennent un repas sanguin sur les souris traitées et contrôles 2, 3, 4 et 5 jours post passage (un groupe de 40 femelles moustiques par souris et par jour). Pour cela, les souris sont anesthésiées par injection i.p. de 5% Rompun® (Xylazine) et 10% Imalgène® (Ketamine) diluée dans du PBS (100 µl pour 10 g de souris) puis exposées aux piqûres de moustiques pendant 15 minutes. Les repas sanguins sont réalisés le matin (8 a.m.). Seules les femelles qui se sont gorgées sont conservées pendant 7 jours avant d'être disséquées dans du PBS pour récupérer leur intestin. Chaque intestin est photographié au microscope à fluorescence Nikon AZ100 et les parasites fluorescents sont comptés sur image] avec le programme watershed. La prévalence (pourcentage de moustiques infectés) et la charge parasitaire (nombre moyen de parasites dans chaque intestin infecté) sont représentées en graph avec le logiciel Prism. Trois expériences indépendantes ont été menées et la significativité des traitements, du temps et des répétitions a été calculée avec un « generalized linear models » du software JMP® software (SAS).

Suivi de la réticulocytémie

La population de réticulocytes ou réticulocytémie est suivie quotidiennement par un prélèvement sur chaque souris de 5µL de sang mélangé à 5µL d'héparine. Des souris naïves sont traitées dans les mêmes conditions que pour l'expérience « Capacité d'un composé à bloquer de la transmission *in vivo* » avec soit du bMD1c, du bleu de méthylène ou du véhicule. Après deux lavages dans 1mL de PBS, le sang est resuspendu dans 100µL de PBS contenant 2% sérum de veau fœtal auquel est ajouté 1µL d'anticorps anti-CD71 de souris couplé à l'APC à 0.2mg/mL (eBioscience). Le tube est incubé 20min à température ambiante dans le noir avant d'être analysé par cytométrie (FACSCalibur™, BD Bioscience). La phénylhydrazine est préparée dans une solution de 0.9% NaCl à 25mg/mL dont

0.1mL est injecté en i.p. pour les souris du contrôle positif. Le reste des traitements administrés aux souris est décrit dans la partie précédente « Capacité d'un composé à bloquer de la transmission *in vivo* ».

Inhibition de la maturation de Plasmodium berghei in vitro

La sensibilité des stades asexués de *P. berghei* aux composés bMD1c, bMD30 et bMD40 a été déterminée en mesurant l'activité de la luciférase de parasites l'exprimant constitutivement après une incubation de 24h *ex vivo* avec différentes concentrations de composé. Le sang de la souris infectée (parasitémie 1-3%) est collecté par ponction cardiaque et lavé à deux reprises dans du milieu RPMI 1640 à 25% de sérum de veau foetal (SVF). Le sang lavé est resuspendu dans ce même milieu à une hématocrite de 4% et exposé pendant 24h à une dilution donnée de bMD1c, bMD40 ou d'autres antipaludiques de référence. Pour cela, les composés sont dissous dans du DMSO ou de l'eau respectivement à une concentration de 6mM (bMD1c, bMD40 et CQ) ou de 10mM (MB, Ato, DHA) avant d'être dilué dans du milieu de culture à 300 ou 100µM suivi d'une dilution en cascade de 1 : 3. Au final, 50µL de ces solutions sont réparties en triplicatas dans une plaque 96 puits noire contenant 50µL de sang à 4% hématocrite (hématocrite finale de 2%). La plaque est incubée pendant 24h à 37°C dans une atmosphère à 5% O₂, 5% CO₂, et 90% N₂, puis centrifugée 1min à 1900 rpm, le surnageant est retiré avant de congeler les plaques à -80°C.

Détermination des IC₅₀ sur les gamétocytes de Plasmodium falciparum in vitro

La sensibilité des gamétocytes de *P. falciparum* aux composés bMD1c, bMD30 ou bMD40 a été déterminée en mesurant l'activité de la luciférase de parasites l'exprimant spécifiquement à ce stade après une incubation de 72h *in vitro* avec différentes concentrations de composé.

La souche de parasite pfs16-GFP-Luc (NF54 background) est maintenue entre 1 et 10% de parasitémie dans du milieu RPMI 1640 avec des globules rouges du groupe A (hématocrite de 2%) et dans 10% de sérum décomplémenté, 9 mM (0.16%) glucose, 0.2 mM hypoxanthine, 2.1 mM L-glutamine, et 20 µg/ml

gentamicine. Les parasites sont incubés à 37 °C dans une atmosphère de 5% O₂, 5% CO₂, et 90% N₂.

Les stades asexués sont d'abord synchronisés dans du 5% D-sorbitol (poids/vol) pendant 10min à 37°C sur deux cycles ou plus si nécessaire. Les cultures synchronisées sont cultivées dans des boîtes de petri jusqu'à atteindre 10% de parasitémie au stade anneau. À ce stade, la gamétogénèse est induite en nourrissant les cultures d'un mix de milieu frais et de milieu vieux (1 :1) (moins on a d'anneaux, plus on garde de milieu). Le jour suivant, les trophozoïtes sont dilués par 4. Deux jours après l'induction (après la rupture des schizonts), un traitement au N-acétyl glucosamine (NAG ; Sigma) est ajouté à la culture à une concentration finale de 50mM. Ce traitement au NAG pendant les 2 ou 3 prochains cycles de réinvasion permet d'éliminer les stades asexués ne s'étant pas convertit en gamétocytes. Les jeunes gamétocytes immatures (stades I et II) sont purifiés sur un gradient de percoll et incubés dans des plaques à 96-puits à gamétocytémie entre 4 et 6% (150 µL/well). Les cultures de gamétocytes sont exposées pendant 72h à différentes dilutions de bMD1c, bMD40 ou de bleu de méthylène (Sigma) ou de milieu démarrant 3, 8 ou 11 jours après l'induction de la gamétogénèse. Pour cela, les composés bMD1c, bMD40 et bleu de méthylène sont dissous dans du DMSO ou de l'eau respectivement à une concentration de 6mM (bMD1c, bMD40) ou 10mM (bleu de méthylène) avant d'être dilué dans du milieu de culture aux concentrations appropriées (150µL à 2% hématocrite en triplicata pour chaque concentration). Après l'exposition aux composés, les parasites sont cultivés 2 jours de plus dans du milieu de culture avant que la plaque soit centrifugée 1min à 1900 rpm, le surnageant est retiré avant de congeler les plaques à -80°C.

Détection de la luciférase des essais in vitro sur P falciparum et berghei

Les plaques congelées à -80°C sont incubées à 37°C pendant au moins 30min. les cellules sont lysées à température ambiante avec 10µL de 1x luciferin lysis buffer (Luciferase Cell Culture Lysis 5x reagent, Promega). Les plaques sont ensuite lues sur le fluorimètre à microplaques GloMax®-multi à un injecteur pour 100µL de luciferase assay substrate (Luciferase Assay System, Promega) par le programme Luciferase Assay System, Promega. Une seconde lecture est réalisée

avec le programme BrightGlo (lecture en balayage sans ajout de composé) à la fin du premier programme, pour la vérification des variations intra-plaque. La moyenne de chaque triplicata est calculée puis normalisée selon la formule : $(Luc_x - Luc_{RBC}) / (Luc_{solvent} - Luc_{RBC})$ avec Luc_x et $Luc_{solvent}$ = moyenne de l'activité luciférase pour les parasites incubés avec le composé x et le solvant (DMSO ou PBS), et Luc_{RBC} = moyenne de l'activité luciférase sur les érythrocytes non infectés (background). Les valeurs d'IC₅₀ ont été calculées avec le logiciel Prism (GraphPad, log(inhibitor) vs. normalized response – variable slope) pour 3 expériences différentes pour l'essai sur les gamétocytes *P falciparum* et 5 pour l'essai sur les stades asexués de *P berghei*.

Suivi de la gamétocytémie in vivo

Pour mesurer la gamétocytémie *in vivo*, le parasite le parasite fluo-frmg (RMgm-164) est utilisé. Ce parasite mutant exprime la GFP sous le contrôle spécifique d'un promoteur gamétocyte mâle (dynein heavy chain, putative) et la RFP sous le contrôle spécifique d'un promoteur gamétocyte femelle (LCCL domain-containing protein CCP2). Les souris sont infectées avec le parasite selon la procédure décrite dans la partie « Passage du parasite *Plasmodium berghei* ». Les parasites se développent durant 3 jours, de façon à obtenir une parasitémie entre 7-12% ainsi qu'une population de gamétocytes (0.2 à 0.4%) identifiable par cytométrie (AccuriC6™, BD Bioscience). À 3 jours post passage, les souris reçoivent une injection de composés selon la procédure décrite dans la partie « Capacité d'un composé à bloquer de la transmission *in vivo* » durant 3 jours consécutifs. Les populations de gamétocytes mâles et femelles sont suivies quotidiennement par cytométrie (AccuriC6™, BD Bioscience).

Mesure de l'exflagellation des mâle gamétocytes

L'exflagellation des gamétocytes mâles est induite par un changement rapide de pH et de température. Entre lame et lamelle, 5µL de sang infecté avec le parasite fluo-frmg (RMgm-164) sont mélangé à 5µL de milieu de oocynète RPMI 1640 contenant de la L-glutamine, 25mM HEPES, 0.85g/L NaHCO₃, 50mg/L Néomycine dans 10% de sérum de veau fœtal à pH 8 à une température de 21°C pendant 15min. Puis le nombre de mâle en exflagellation est compté ainsi que le

nombre d'érythrocytes présents dans le champ du microscope. Un suivi par cytométrie, permet de détecter le nombre gamétocytes mâles présents dans le même échantillon. Cela permet d'obtenir le pourcentage de mâle gamétocytes en exflagellation sur le nombre d'érythrocytes relatif au pourcentage de mâle en gamétocytes sur le nombre d'érythrocytes, soit le pourcentage de mâle gamétocytes fonctionnels.

Inhibition de la maturation des oocinètes de Plasmodium berghei in vitro

L'induction des gamétocytes (PbGFPcon) en gamètes se fait par l'introduction de 5 μ L de sang infecté avec le parasite fluo-frmg (RMgm-164) dans un tube eppendorf contenant 0.8-1mL de milieu dit de oocynètes (milieu décrit précédemment) avec 5 μ L d'héparine à une température de 21°C pendant 1h. Cette durée permet la formation des gamètes, leur fertilisation en zygote, puis le début de la différenciation en oocynète. Une dilution des composés bMD1c et bMD40 sont ajoutés, ramenant le volume à 1mL pour chaque tube eppendorf, selon les concentrations croissantes de composé (0, 5, 10, 25, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000 nM). Les tubes sont incubés pendant 24h à 21°C avant d'être vortexés et centrifugés. Pour chaque concentration un frottis sanguin « en étoile » est réalisé. Après fixation au méthanol et coloration au Giemsa, les oocynètes matures, immature et dégénérés sont comptabilisés. Il est conseillé de réaliser 2 frottis par échantillon en cas de mauvaise coloration du premier échantillon. Un pourcentage des oocinètes mature relatif aux oocinètes immature et dégénérés est calculé. Les valeurs d'IC₅₀ ont été calculées avec le logiciel Prism (GraphPad, log(inhibitor) vs. normalized response – variable slope) pour 3 expériences différentes pour l'essai avec bMD1c, 2 pour bMD40 et le bleu de méthylène.

Les valeurs IC₅₀ pour la chloroquine et l'atovaquone viennent de la publication (M. J. Delves et al., 2012). Cette équipe a réalisé un test comptant des différences par rapport à notre protocole. Ces différences sont reportées dans le tableau suivant :

	Méthodes chez Delves	Méthodes à l'IBMC
Volume de la culture	50 µL	1000 µL
Contenant de la culture	plaques 96-puits	Tube eppendorf
Temps d'incubation avant frottis	22h	24h
Hématocrite finale	1 : 20	1 : 200
Pourcentage de sérum	20%	10%

Figure 29 : Différences entre les deux tests d'inhibition de la maturation des oocynètes de *Plasmodium berghei in vitro* utilisés à l'IBMC ou dans l'équipe Delves.

Mesure de la maturation des oocynètes de Plasmodium berghei in vivo

La mesure de la maturation en oocynète est réalisée en parallèle du protocole « Capacité d'un composé à bloquer de la transmission *in vivo* ». À 1 jour après la première injection de composé 5µL de sang infecté avec le parasite PbGFPcon sont introduits dans un tube eppendorf pour chaque composé contenant 1mL de milieu dit de oocynètes (milieu décrit précédemment) et 5µL d'héparine à une température de 21°C pendant 1 jour. Les tubes sont vortexés et centrifugés, avant de réaliser un frottis sanguin « en étoile » pour chaque composé. Après fixation au méthanol et coloration au Giemsa, les oocynètes matures, immature et dégénérés sont comptabilisés. Un pourcentage des oocynètes mature relatif aux oocynètes dégénérés est calculé (les immatures sont ignorés ici) pour les 2 expériences différentes qui ont été réalisées.

Collecte des urines de souris

La collecte des urines est réalisée en parallèle du protocole « Suivi de la réticulocytémie ». À 1 jour après chaque injection, les souris naïves sont placées sur une surface en plastique plane et propre et sont maintenues par la peau du dos afin de les faire uriner. L'urine est alors récoltée avec une pipette et placée dans un tube eppendorf. Les tubes sont conservés à -20°C avant d'être analysés par LC-MS/MS par la compagnie TechMed^{ill} (Illkirch-France).

Résultats du chapitre 2

Les bMDs sont efficaces contre P. berghei in vitro mais leur efficacité est réduite in vivo

Les composés bMDs sont efficaces à des concentrations de l'ordre du nanomolaire sur les cultures de *P. falciparum in vitro* (Ehrhardt et al., 2016). Pour déterminer leur activité contre *P. berghei* ANKA, les molécules ont été testées *in vitro* contre la souche *PbGFP-luc*, exprimant la luciférase. Les antipaludiques suivants ont été utilisés comme contrôles : la chloroquine (CQ), l'artémisinine (ART), le bleu de méthylène (MB). Les IC_{50} mesurées sont regroupées dans la figure 30 A.

Le composé leader bMD1c s'était montré efficace contre *P. falciparum* avec une IC_{50} de 46 nM (Ehrhardt et al., 2016). Contre *P. berghei*, il présente une IC_{50} de 26 nM. Notons que l' IC_{50} de bMD1c contre *P. berghei* est similaire à celle du bleu de méthylène et est deux fois plus basse que l' IC_{50} contre *P. falciparum*. Le composé bMD30 présente des IC_{50} similaires pour *P. falciparum* et *P. berghei*, de l'ordre de 55nM. Le composé bMD40 est aussi efficace que bMD1c contre *P. falciparum*. En revanche il est extrêmement efficace contre *P. berghei* avec une IC_{50} 150x plus basse que celle du bleu de méthylène et 200x plus basse que celle de bMD1c.

In vivo nous avons mesuré la parasitémie de souris infectées avec *P. berghei* et traitées quotidiennement par injection i.p. pendant trois jours (figure 30 B et C). Le composé bMD1c réduit de manière significative la parasitémie *in vivo* avec une efficacité de 20.7% le jour 3 et 50% le jour 4 mais reste moins efficace que le bleu de méthylène qui réduit la parasitémie avec une efficacité de 95 et 96.6% (figure 30 B et C). Dans les résultats précédemment publiés, le bMD1c présentait une efficacité de 20.7-28.4% après quatre injections, 4 jours post-infection (Müller et al., 2011). Les résultats mesurés ici sont parfaitement cohérents et confirme ceux mesurés en 2011.

Le bMD1c possède une IC_{50} équivalente à celle du bleu de méthylène *in vitro* contre *P. berghei*. Or, *in vivo*, bMD1c est moins efficace que le bleu de méthylène

pour réduire la parasitémie. Cette perte d'efficacité lors du passage de *l'in vitro* à *l'in vivo* traduit une faible biodisponibilité du composé bMD1c. Une amélioration chimique du composé pourrait améliorer ses propriétés pharmacocinétiques, le rendre plus biodisponible et efficace.

Les composés bMD30 et bMD40 réduisent significativement la parasitémie *in vivo*, avec des différences d'efficacité importantes dès le jour 3 : 33 % d'efficacité pour bMD30 contre 73 % pour bMD40. Ces différences s'accroissent encore le jour 4 avec une efficacité de 32 % pour le bMD30 et de 89.9 % pour bMD40.

Si le composé bMD30 est moins efficace *in vivo* que bMD1c, le bMD40 est plus efficace que le bMD1C dès le jour 3.

Il est important de rappeler ici que *P. berghei* envahit préférentiellement les réticulocytes aux normocytes. Nous avons donc dans un second temps vérifié que l'activité des bMDs n'était pas due à une baisse de la réticulocytémie, et donc indirectement de la parasitémie.

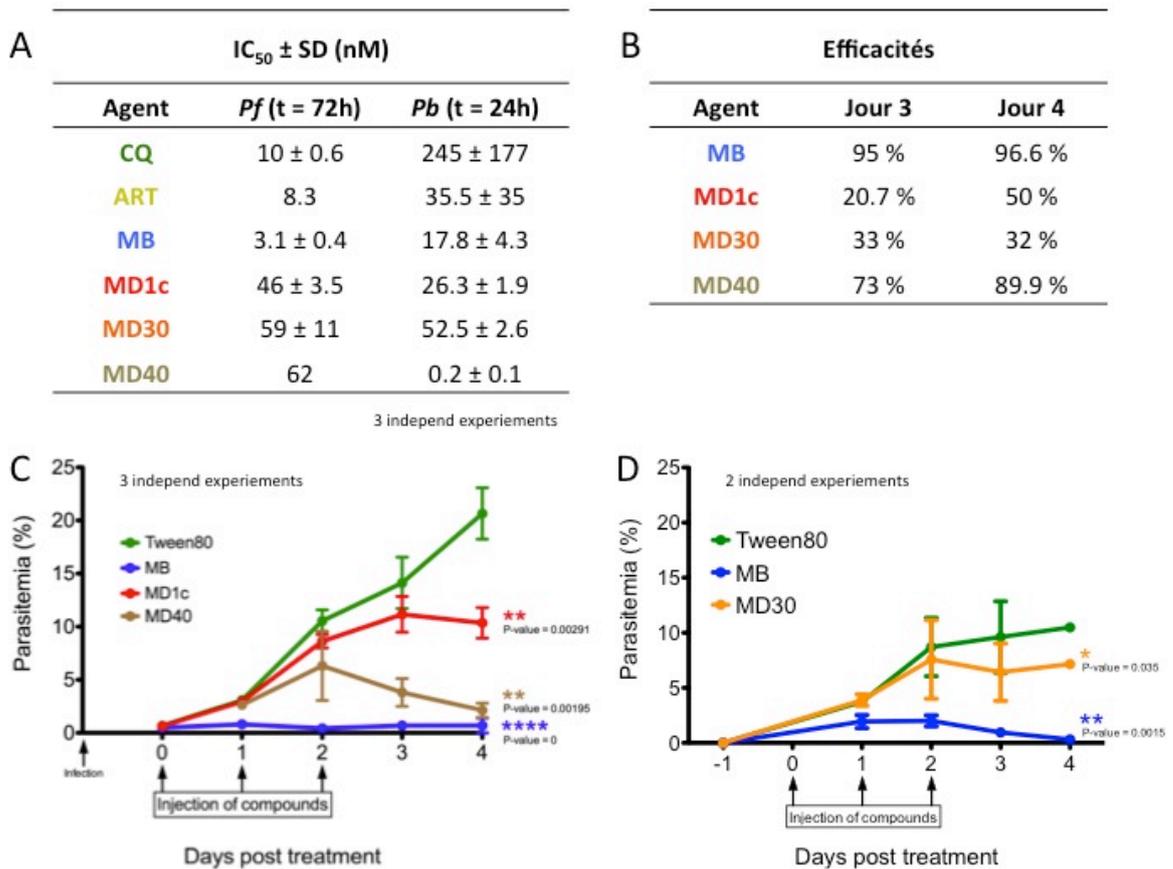


Figure 30 : Activité *in vitro* et *in vivo* du composé tête de série bMD1c et des dérivés bMD30 et bMD40 contre *P. falciparum* et *P. berghei*.

(A) IC₅₀ d'antipaludiques contre les stades asexués de *P. berghei in vitro* sont comparées à celles contre *P. falciparum*. Les mesures sur *P. falciparum* ont été réalisées par K. Ehrhardt (Ehrhardt et al., 2016). (B) Efficacité *in vivo* des bMDs et du bleu de méthylène. (C) et (D) Suivi de la parasitémie *in vivo* au cours du temps dans les souris recevant une injection de bMDs (30mg/kg) ou de bleu de méthylène (15mg/kg) par jour pendant trois jours consécutifs débutant 24h après infection. La parasitémie des souris est mesurée quotidiennement avant chaque traitement. Le tween80 est le véhicule utilisé pour ces composés (70% tween80, 30% EtOH, 1/10 in H₂O) ; il sert de contrôle négatif, le bleu de méthylène sert de contrôle positif.

CQ : chloroquine ; ART : artémisinine ; MB : bleu de méthylène ; MD1c : benzylmenadione 1c ; MD30 : benzylmenadione fluoré ; MD40 : dérivé benzylmenadione.

bMD1c n'affecte pas la réticulocytémie

Afin de déterminer si la population de réticulocytes (réticulocytémie) est modifiée par les injections de bMD1c ou de son véhicule décrites précédemment, un échantillon de sang est prélevé quotidiennement puis passé au cytomètre.

La phénylhydrazine est responsable de la destruction massive des normocytes et donc de la production de réticulocytes par la souris en réponse (Singer et al., 1954). La phénylhydrazine est utilisée ici comme contrôle positif et confirme que la détection des réticulocytes est correcte avec une augmentation de leur pourcentage 48h après l'injection. La population atteint son maximum, 13.9% à 5 jours après injection de phénylhydrazine, puis diminue.

Dans une souris naïve et non traitée, la réticulocytémie varie de 0.4% à 2.1%. Lorsque les souris naïves sont traitées avec le bleu de méthylène, le bMD1c ou le véhicule, la réticulocytémie varie entre 1.2% et 2.6%. La réticulocytémie des souris sous traitement ne varie pas par rapport à la réticulocytémie de souris non traitées. Ainsi, l'effet de bMD1c sur la parasitémie est dû à une action directe de l'agent sur le parasite.

Le bMD1c réduit la parasitémie des souris *in vivo*. Nous avons ensuite cherché à connaître sa capacité à réduire la transmission du parasite aux moustiques *in vivo*.

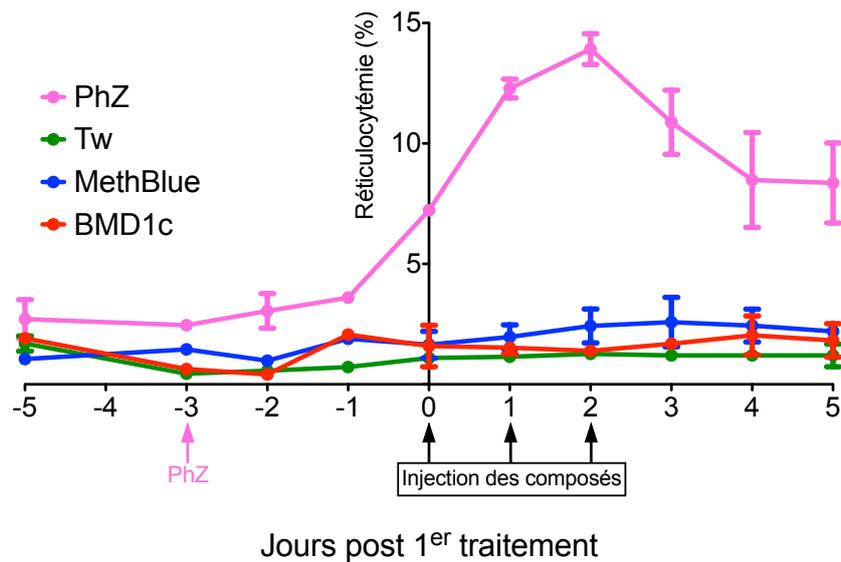


Figure 31 : Effet du composé leader bMD1c, de son véhicule ainsi que du bleu de méthylène et de la phénylhydrazine sur la réticulocytémie des souris après injection quotidienne pendant 3 jours.

MB = bleu de méthylène (15mg/kg); MD1c and MD40 (30mg/kg); Tw = véhicule (70% tween80, 30% EtOH, 1/10 in H2O); la PhZ = phénylhydrazine (125mg/kg), est injectée une seule fois (jour -3).

Les bMD1c et bMD40 réduisent la transmission du parasite au moustique

La réduction de la transmission du parasite au moustique peut se traduire par une diminution de la prévalence (pourcentage des moustiques infectés avec au moins un parasite) ou de la charge parasitaire (nombre de parasites par moustique infecté). Le bleu de méthylène est ici utilisé comme contrôle positif, connu pour sa capacité à bloquer la transmission.

Le bMD1c réduit la prévalence de manière significative dès la deuxième injection (figure 32 A, jour 2), effet qui perdure pendant au moins deux jours après le dernier traitement (figure 32 A, jours 3 et 4). Il réduit également et durablement la charge parasitaire dès la première injection (figure 32 A, jours 1-4).

La bMD40 est encore plus efficace. Ce dérivé de bMD1c réduit (i) la prévalence et la charge parasitaire dès la première injection, et (ii) divise la prévalence par 10 par rapport au contrôle après les 3 traitements, contre seulement 2 pour le

bMD1c le même jour (figure 32 A, jour 3). Noter cependant une augmentation de la charge parasitaire et de la prévalence deux jours après le dernier traitement (figure 32 A, jour 4).

La bMD30 quant à elle, ne présente pas d'activité anti-transmission intéressante (figure 32 B).

L'effet des dérivés bMD1c et bMD40 mesuré sur la transmission pourrait être dû (i) à une réduction de la réticulocytémie (hypothèse rejetée par l'expérience précédente) ; (ii) à une réduction de la parasitémie (moins de parasites asexués amène à une baisse de la gamétoctémie) ; (iii) à un effet sur les stades sexués du parasite. Il semblerait que les deux dernières hypothèses soient les bonnes.

Nous avons donc cherché à quantifier l'effet de ces composés sur différents stades sexués, seuls stades du parasite capables de se développer dans le moustique.

Les outils alors à ma disposition impliquaient les deux espèces de *P. falciparum* et *P. berghei*. L'effet sur les gamétocytes a été testé d'abord *in vitro* sur *P. falciparum*, afin d'évaluer si l'action était significative dans des conditions optimales pour les composés (pas de problème de biodisponibilité), puis de vérifier ces effets *in vivo* contre *P. berghei*.

Les stades oocinètes sont particulièrement laborieux à obtenir avec *P. falciparum*, alors qu'il est très aisé de les induire avec *P. berghei*.

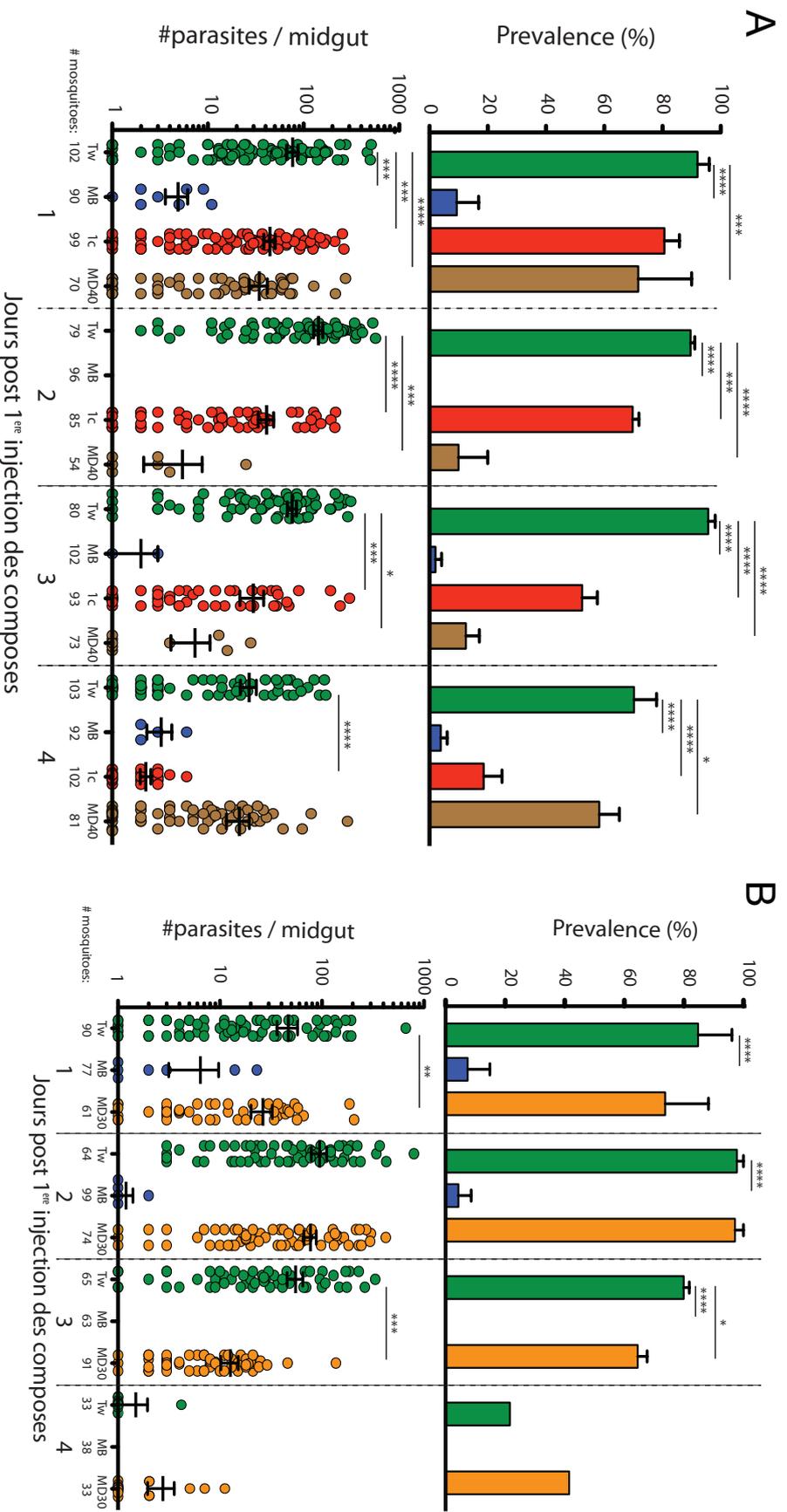


Figure 32 : Capacité du composé tête de série bMD1c et des dérivés bMD30 et bMD40 et du contrôle bleu de méthylène à bloquer *in vivo* la transmission du parasite *P. berghei* au moustique *A. gambiae*.

In vivo les souris reçoivent une injection de bMDs (30mg/kg) ou de bleu de méthylène (15mg/kg) par jour pendant trois jours consécutifs débutant 24h après infection. À partir du jour 1, soit 1 jour post premier traitement et 2 jours post infection, un groupe de 40 femelles *A. gambiae* sont nourries sur chaque souris anesthésiée pendant 15min. Ce processus est répété les jours 2, 3 et 4. Le Tween80 est le véhicule utilisé pour ces composés (70% tween80, 30% EtOH, 1/10 in H₂O). Il sert de contrôle négatif, le bleu de méthylène sert de contrôle positif.

MB = bleu de méthylène (15mg/kg); MD1c, MD30 and MD40 (30mg/kg); Tw = vehicle of the compounds (70% tween80, 30% EtOH, 1/10 in H₂O). Les souris reçoivent 1 injection par jour pendant 3 jours consécutifs.

bMD1c et bMD40 sont actifs contre les gamétocytes de P. falciparum : jeunes ou tous les stades, respectivement

Les gamétocytes sont capables d'infecter les femelles anophèles lorsque celles-ci prennent un repas sanguin sur un humain infecté. Pour déterminer l'action des composés sur les gamétocytes de *P. falciparum*, nous avons exposé ces gamétocytes à différents stades de maturation (stades II-III, IV et V) et à des concentrations croissantes de composés pendant 72h. Le bleu de méthylène, connu pour son activité anti-gamétocyte (Adjalley et al., 2011), est utilisé comme contrôle positif et s'est montré très efficace avec des IC_{50} de l'ordre du nanomolaire contre tous les stades. Les deux dérivés bMD1c et bMD30 présentent une forte activité contre les jeunes gamétocytes (II-III) avec une IC_{50} de l'ordre de la vingtaine de nanomolaire (figure 32) mais une faible activité contre les stades pré-matures (IV) et matures (V) avec des IC_{50} de l'ordre du micromolaire (figure 32). Le bMD40 s'est montré efficace autant que le bleu de méthylène contre tous les stades avec des IC_{50} de 4nM, 83nM et 228nM pour les stades II-III, IV et V respectivement, (figure 33).

<i>Pf</i> NF54 gamétocytes (4-6 %) IC ₅₀ ± SD (nM)			
Agent	Jeunes	Mid	Matures
MB	24.01 ± 10.5	157 ± 181	97 ± 17.7
bMD1c	20.8 ± 26	3623.5 ± 3970	11017 ± 10017
bMD30	20.2 ± 27	4010 ± 3633	8195 ± 4978
bMD40	4.35 ± 4.7	82.8 ± 20	227.8 ± 58

3 expériences indépendantes (MB, bMD1c and bMD30)
2 expériences indépendantes (bMD40)

Figure 33 : Activité *in vitro* des composés bMD1c, bMD30 et bMD40 ainsi que de l'antipaludique contrôle bleu de méthylène contre 3 stades de gamétocytes de *P. falciparum* de la souche pfs16-GFP-Luc (Adjalley et al., 2011). Jeunes = jeunes gamétocytes stades II-III de 3 à 5 jours ; Mid = gamétocytes pré-matures stade IV de 8 à 10 jours ; Matures = gamétocytes matures stade V de 11 à 13 jours. IC₅₀ : Concentration inhibitrice ; SD : écart type ; MB : bleu de méthylène ; bMD1c : benzylmenadione 1c ; bMD30 : benzylmenadione fluoré ; bMD40 : benzylmenadione optimisée.

bMD1c et bMD40 réduisent le nombre de gamétocytes mâles de P. berghei ainsi que leur fonctionnalité

Afin de tester l'effet des bMDs sur la gamétocytémie *in vivo*, nous avons utilisé une souche de parasite *P. berghei* transgénique exprimant spécifiquement soit la GFP pour les gamétocytes mâles et la RFP pour les femelles. En traitant les souris infectées par 3 injections quotidiennes et suivant la gamétocytémie par cytométrie, nous avons pu déterminer l'activité des composés *in vivo*. La gamétocytémie étant variable entre chaque souris, les valeurs présentées correspondent à la gamétocytémie mesurée divisée par la gamétocytémie le jour du premier traitement (figure 34).

Aucun composé ne semble agir sur la population de gamétocytes femelles : l'évolution de cette population reste similaire entre souris traitées et souris contrôle. À noter cependant que le bleu de méthylène n'a pas eu d'effet sur cette

population (figure 34 A). Les composés bMD1c et bMD40 induisent une diminution de la population de gamétocytes mâles dès la première injection. Il est difficile de conclure pour les injections suivantes car la population de gamétocytes mâles chute lorsque la parasitémie croît de façon exponentielle, y compris dans des souris non traitées (figure 34 B). Nous avons cherché à savoir si en plus de réduire le nombre de gamétocytes mâles, les composés bMD1c et bMD40 nuisaient aussi à leur fonctionnalité en réduisant leur capacité à exflageller.

Le pourcentage de mâles exflagellant a d'abord été compté par rapport au nombre de normocytes dans le champ du microscope (quantification similaire à un calcul de parasitémie), puis ce pourcentage est divisé par le pourcentage de gamétocytes mâles mesurés le même jour par cytométrie. Nos résultats suggèrent que les composés bMD1c et bMD40 réduisent l'exflagellation des gamétocytes mâles (figure 34 C). Les deux composés permettent donc à la fois de réduire le nombre de gamétocytes mâles et leur fonctionnalité. Ce résultat est très encourageant car l'exflagellation des mâles gamétocytes est une étape critique pour que le parasite puisse infecter le moustique et continuer son cycle de vie.

Il est important de noter que sur ces 4 expériences, nous n'avons pas observé d'effet du bleu de méthylène sur le nombre de gamétocytes (mâles ou femelles), mais une diminution de la capacité des gamétocytes mâles à exflageller. Ce résultat est contradictoire à ce que nous attendions car le bleu de méthylène est connu pour être un composé gamétocytocide et a prouvé son efficacité contre les gamétocytes de *P. falciparum in vitro*. Nous reviendrons sur ce phénomène dans la discussion de ce chapitre.

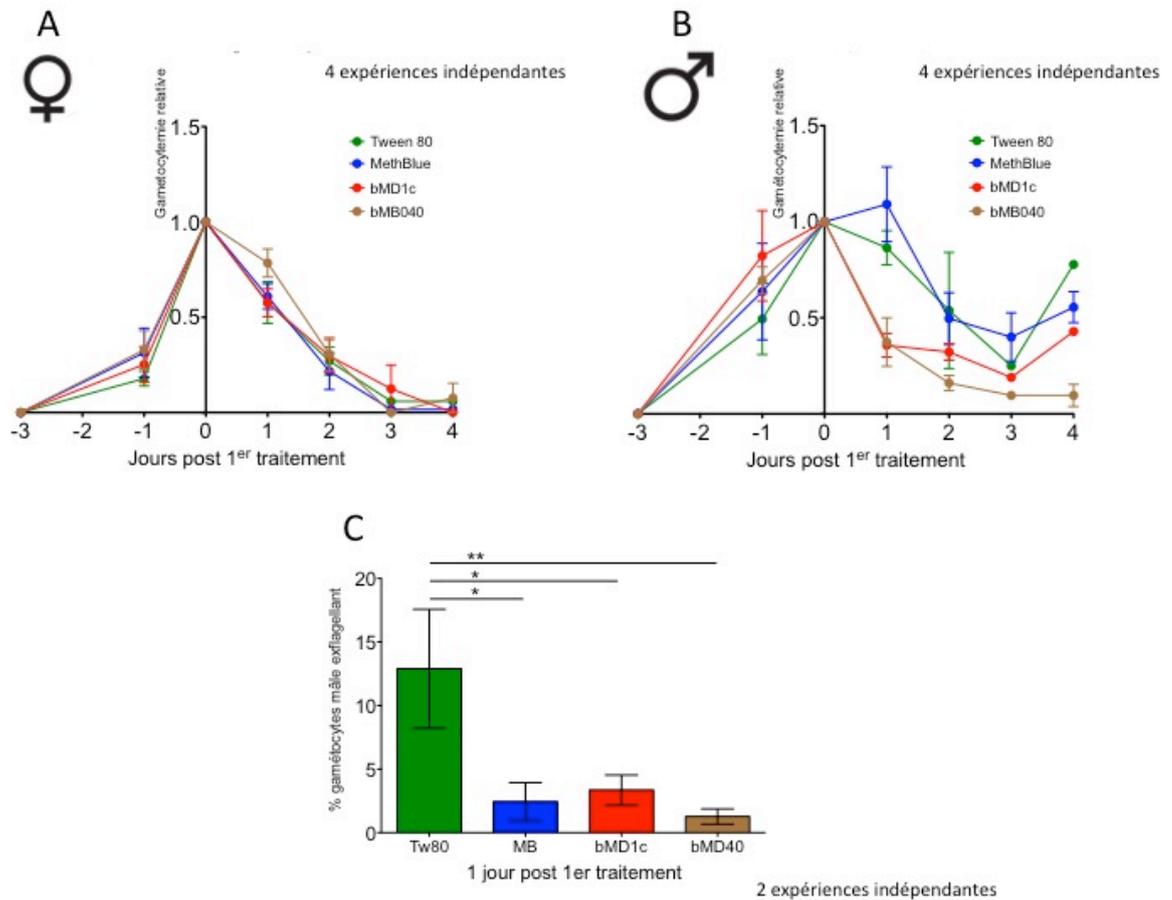


Figure 34 : Activité *in vivo* des composés bMD1c, bMD30 et bMD40 ainsi que de l'antipaludique bleu de méthylène contre les gamétocytes *P. berghei in vivo*. L'effet observé sur le ratio des gamétocytemies femelles (A) et mâles (B) de *P. berghei*. Le ratio a été calculé en divisant les gamétocytemies (mâle ou femelle) par la valeur mesurée le premier jour avant le premier traitement. (C) Pourcentage des mâles gamétocytes en exflagellation. 24h après le premier traitement, le pourcentage de gamétocytes exflagellant est divisé par le pourcentage de gamétocytes mâles mesurés le même jour. MB : bleu de méthylène (15mg/kg) ; bMD1c : benzylmenadione 1c and bMD40 : benzylmenadione optimisée (30mg/kg) ; Tween80= Tw80 = véhicule des composés (70% tween80, 30% EtOH, 1/10 in H₂O). Les souris reçoivent 1 injection par jour pendant 3 jours consécutifs.

bMD1c et bMD40 empêchent la maturation des oocinètes

Les oocinètes sont issus de la fécondation des gamétocytes mâles et femelles et sont les premiers stades motiles dans le moustique. Ils traversent l'épithélium de l'intestin pour se développer en oocyste. Si les gamétocytes sont exposés *in vitro* à une chute de température et une augmentation du pH, ils se différencient en gamètes pour la fécondation qui deviennent des zygotes puis en oocinète. Il est possible d'induire la fécondation des gamètes *in vitro*. Les oocinètes formés 1h après cette induction peuvent être exposés à des concentrations de composés croissantes, permettant de déterminer leur IC₅₀ par le décompte du nombre de oocinètes matures, dégénérés ou de zygotes.

Si la chloroquine n'est pas active contre les oocinètes, l'atovaquone possède une IC₅₀ de plusieurs dizaines de nanomolaire (78 nM) contre ces mêmes stades (M. J. Delves et al., 2012). Les bMD1c et bMD40 sont actifs contre les oocinètes de *P. berghei* avec une IC₅₀ de l'ordre du nanomolaire (36 et 20 nM respectivement) (figure 35).

<i>Pb</i> ANKA oocinètes IC ₅₀ ± SD (nM)	
CQ	Not sensitive*
Ato	78*
MB	0.47 ± 0.02
bMD1c	36.3 ± 15
bMD30	N.D.
bMD40	20.6 ± 4

*MJ. Delves, 2012
3 expériences indépendantes pour bMD1c, 2 pour MB et bMD40

Figure 35 : Activité *in vitro* des composés bMD1c, bMD30 et bMD40 ainsi que des agents antipaludiques contrôles bleu de méthylène, chloroquine et atovaquone contre les oocinètes de *P. berghei*.

Les différences entre les expériences faites à l'IBMC et celles publiées par l'équipe Delves sont détaillées dans le matériel et méthode.

CQ : chloroquine ; Ato : atovaquone ; MB : bleu de méthylène ; bMD1c : benzylmenadione 1c ; bMD30 : benzylmenadione fluoré ; bMD40 : benzylmenadione optimisée.

Pour évaluer l'activité du bMD1c sur ce même stade nous avons induit la formation en oocinète de parasites ayant été exposé au bMD1c *in vivo* pendant le traitement de la souris lors des injections quotidiennes. Un échantillon de 5µL de sang est prélevé chaque jour 24h après chaque injection est placé dans du milieu pour oocinète induisant la maturation en oocinètes sur 24h. Un frottis est réalisé pour chaque échantillon et les oocinètes matures et dégénérés sont comptés.

Dans ce cas le calcul d'une IC₅₀ n'est pas possible mais on constate que les souris traitées avec le véhicule montre un pourcentage d'oocinètes matures bien supérieur (de 87 à 55%) aux souris traitées avec du bleu de méthylène, du bMD1c ou du bMD40 (de 0 à 20%) (figure 36). Cette tendance va dans le sens des résultats précédents, à savoir que bMD1c et bMD40 réduisent le nombre des gamétocytes mâles et aussi leur capacité à exflageller. La fécondation des gamètes ne se fait plus ou mal, les oocinètes matures et capables de traverser les membranes épithéliales sont fortement réduits et l'infection du moustique est stoppée à cette étape.

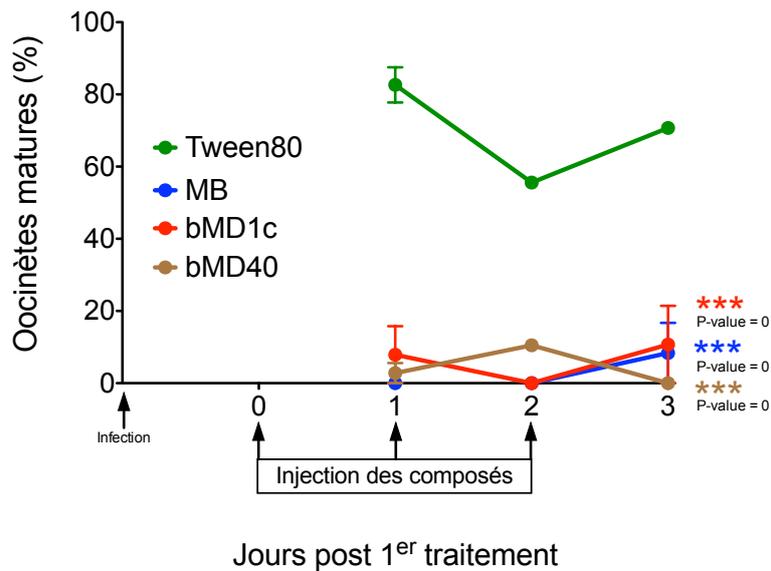


Figure 36 : Activité *in vivo* du composé leader bMD1c, de bMD40 (30mg/kg) et du bleu de méthylène (15mg/kg) contre les stades oocinètes de *P. berghei in vivo*.

Le nombre d'oocinètes matures est rapporté au nombre d'oocinètes total (dégénérés + mature). Le Tween80 est le véhicule utilisé pour ces composés (70% tween80, 30% EtOH, 1/10 in H₂O). Les souris reçoivent une injection par jour pendant trois jours consécutifs débutant 24h après une infection i.v. Un échantillon de sang est prélevé 24h après chaque injection pour une induction des oocinètes. Un frottis est réalisé 24h après et les oocinètes matures sont comptés. MB : bleu de méthylène ; bMD1c : benzylmenadione 1c ; bMD30 : benzylmenadione fluoré ; bMD40 : benzylmenadione optimisée. Cette expérience a été réalisée 2 fois de façon indépendante.

bMD1c est excrété dans les urines de souris traitées

Des études de spectrométrie de masse ont été réalisées avec des urines de souris traitées quotidiennement pendant 3 jours par une injection de bMD1c ou de véhicule. Elles ont montrées que le bMD1c est excrété dans les urines *per se* et sous forme d'un métabolite glucuroconjugué. Cette métabolisation aurait lieu par une première oxydation du bMD1c catalysée par un cytochrome P₄₅₀ pour donner un composé hydroxylé. Ce métabolite hydroxyle serait ensuite conjugué à l'acide glucuronique par une glucuronosyl-transférase pour faciliter son

excrétion. Cette élimination rapide du composé pourrait également expliquer en partie sa perte d'efficacité.

Une étude similaire est actuellement en cours pour déterminer si le dérivé bMD40 est métabolisé ou/et éliminé de la même façon.

Conclusions et perspectives du chapitre 2

Ce chapitre résume les caractéristiques *in vitro* et *in vivo* de trois composés de la famille des bMDs contre les stades asexués et sexués de *P. berghei* et *P. falciparum*. Ces résultats sont très encourageants pour le devenir de cette série de molécules.

Le composé leader bMD1c est actif *in vivo* et réduit la parasitémie et la transmission du parasite au moustique (prévalence et charge parasitaire). Il est cependant moins efficace *in vivo* qu'en conditions *in vitro*. Cette différence d'efficacité peut s'expliquer par deux facteurs : (i) bMD1c se lie aux protéines sériques (IC_{50} cinq fois plus élevée, sur la base des résultats du test d'influence du sérum réalisé à Bâle, figure 26) et (ii) le bMD1c est éliminée et passe dans les urines sous forme glucuroconjuguée.

Pour ces raisons, de nouveaux dérivés du bMD1c ont été conçus, synthétisés dans le laboratoire de chimie médicinale, puis testés *in vivo* : la bMD30 qui ne se lie pas aux protéines sériques (IC_{50} ne change pas en absence ou présence de sérum, sur la base des résultats du test d'influence du sérum réalisé à Bâle, figure 26) et la bMD40, porteur d'un groupe solubilisant, augmentant la solubilité et protégeant un site d'attaque nucléophile sur les bMDs.

Aucune amélioration de l'activité *in vivo* n'a été observée avec la molécule bMD30, voire bMD30 est moins efficace que bMD1c. La perte d'efficacité du bMD1c *in vivo* n'est donc pas due au fait que les molécules se lient aux protéines sériques.

Le bMD40 a montré une très forte amélioration des propriétés *in vivo* par rapport au bMD1c. Le bMD40 est plus efficace que bMD1c pour réduire la parasitémie et la transmission (prévalence et charge parasitaire). La plus grande solubilité du bMD40 et sa protection contre les attaques nucléophiles, pourraient

expliquer sa plus grande efficacité. Des tests sont en cours pour vérifier son élimination dans les urines sous forme glucuroconjuguée ou non.

Pour évaluer l'impact des bMD1c et bMD40 sur la transmission, nous avons étudié leurs effets sur les stades sexuels.

In vitro, l'action des dérivés bMD1c et bMD30 sur les gamétocytes de *P. falciparum* se limite aux jeunes stades (II-III), alors que la bMD40 est capable d'éliminer tous les stades des gamétocytes *P. falciparum* (II-III, IV et V) aussi efficacement que le bleu de méthylène.

In vivo, les dérivés bMD1c et bMD40 réduisent le nombre de gamétocytes mâles mais aussi leur fonctionnalité : les mâles gamétocytes exflagellent moins. L'absence d'efficacité des composés bMDs ou du bleu de méthylène sur les gamétocytes *P. berghei* femelles, est sans doute liée à une plus grande résistance des femelles au stress oxydatif par rapport aux mâles. Chez *P. falciparum*, il a été montré que les gamétocytes femelles sont plus résistants que les mâles aux antipaludiques et que les gamétocytes mâles sont plus sensibles au stress oxydatif que les femelles (M. J. Delves et al., 2013). L'absence d'efficacité du bleu de méthylène montre une contradiction avec son efficacité *in vitro* contre les gamétocytes de *P. falciparum*. Cette différence pourrait être due à la différence de gamétocytogénèse entre les deux espèces : 25h pour *P. berghei* contre 12 jours pour *P. falciparum*. Les gamétocytes de *P. berghei* traités au bleu de méthylène pourraient être encore visibles (cellule contenant la GFP détectée au cytomètre) mais non fonctionnels (effet de la réduction de la transmission). Le bleu de méthylène inhibe l'exflagellation des mâles gamétocytes *P. falciparum* (M. J. Delves et al., 2013; Ruecker et al., 2014) et *P. berghei*. Par ailleurs, lorsque de jeunes gamétocytes de *P. falciparum*, sont exposés au bleu de méthylène, ils n'atteignent pas le stade de gamétocytes matures (Adjalley et al., 2011).

Enfin, en présence de bMD1c ou de bMD40, la formation des oocinètes de *P. berghei* est altérée *in vitro* mais aussi *in vivo*.

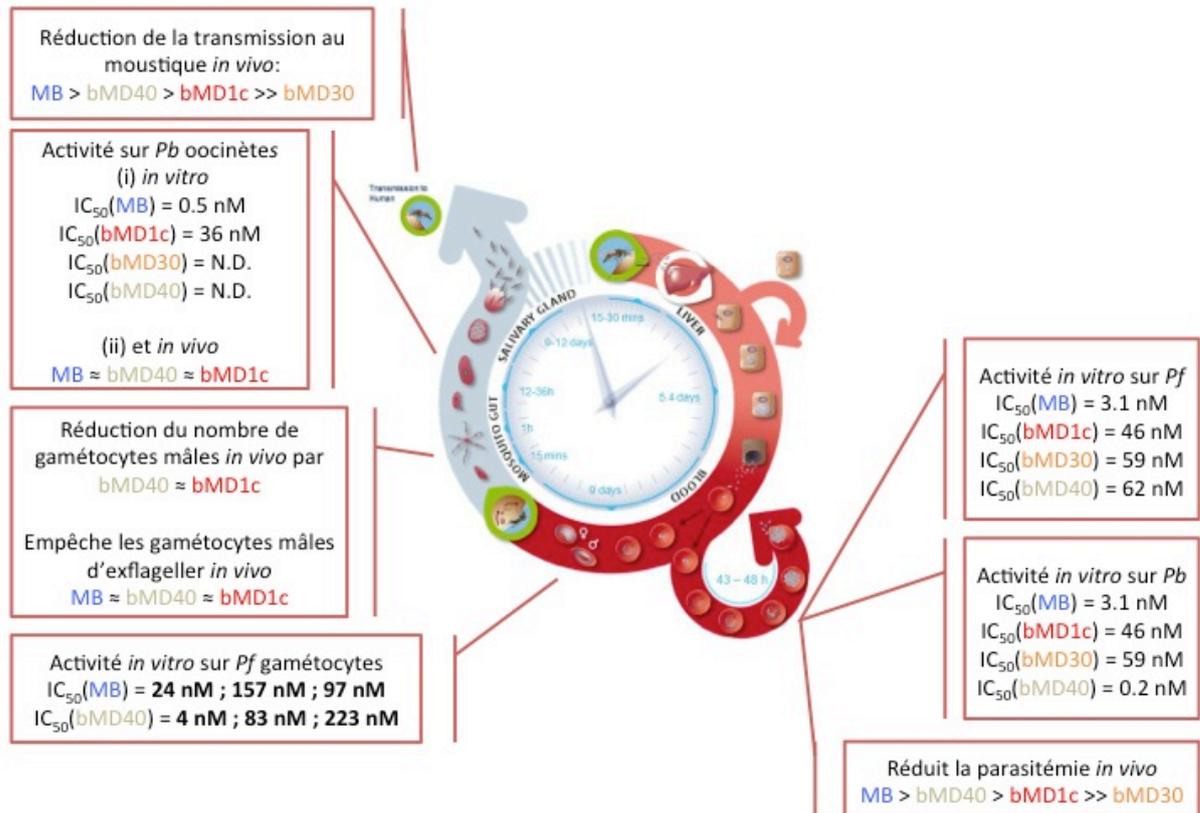


Figure 37 : Figure récapitulative des activités des composés bMD1c, bMD30, bMD40 et du bleu de méthylène contre *P. falciparum* et *P. berghei* tout au long de leur cycle. Figure du cycle tirée de la publication (M. Delves et al., 2012). MB : bleu de méthylène ; bMD1c : benzylmenadione 1c ; bMD30 : benzylmenadione fluoré ; bMD40 : benzylmenadione optimisée.

En conclusion de ce chapitre, les dérivés bMD1c et bMD40 présentent des propriétés antipaludiques très intéressantes avec une double activité (i) sur les stades asexués, permettant de soigner l'hôte humain et (ii) sur les stades sexuels infectieux pour le moustique, limitant la transmission du parasite à d'autres hôtes humains.

Le bMD1c est un composé à action rapide, ciblant particulièrement les stades asexués anneaux. Elle pourrait être utilisée de façon très efficace à d'autres antipaludiques dans différentes combinaisons thérapeutiques.

Dans le souci de définir l'action sur le cycle complet du parasite, il serait intéressant de tester l'effet des bMD1c et bMD40 sur les stades hépatiques.

Le mode d'activation et d'action des bMDs reste à comprendre. Des études biochimiques ont été menées pour tenter de prouver un mode d'action proposé (Bielitza et al., 2015a; Ehrhardt et al., 2016; Müller et al., 2011). Mais ce mode d'action n'a encore été confirmé *in situ* dans le parasite vivant.

Dans le chapitre suivant, nous avons essayé d'évaluer le modèle établi des bMDs *in vivo*.

CHAPITRE 3 : ETUDE DU MODE D'ACTION DES
BENZYL-MENADIONES : INVALIDATION DE
QUATRE ENZYMES CLES DU MODELE DANS DES
PARASITES *P. BERGHEI* MUTANTS

Introduction du chapitre 3

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés au mode d'action du bMD1c, notre composé de tête.

Le mode d'action du bMD1c n'est pas celui de l'atovaquone

L'atovaquone est un antipaludique développé après la seconde guerre mondiale pour palier au manque de quinine. Il est utilisé à dose constante sous forme du Malarone (accompagné du proguanil) pour soigner les crises de paludisme non sévères chez l'adulte et l'enfant ainsi que pour la chémoprévention (Nixon et al., 2013).

L'atovaquone est une 3-hydroxy-1,4-naphthoquinone et un inhibiteur compétitif de l'ubiquinol, plus spécifiquement du complexe bc1 de la chaîne de transport d'électrons de la mitochondrie. L'atovaquone se lie au site d'oxydation de l'ubiquinone du cytochrome bc1, qui est un composant essentiel du complexe III. Ainsi, le potentiel de membrane de la mitochondrie décroît bloquant la synthèse de l'orotate par la dihydroorotate déshydrogénase (DHODH), composé essentiel dans la synthèse de la pyrimidine par le parasite (Ehrhardt et al., 2013b; Ganesan, Morrisey, Ke, & Painter, 2012; Kessl et al., 2005; Nixon et al., 2013; Song, Clain, Iorga, Yi, & Fisher, 2015).

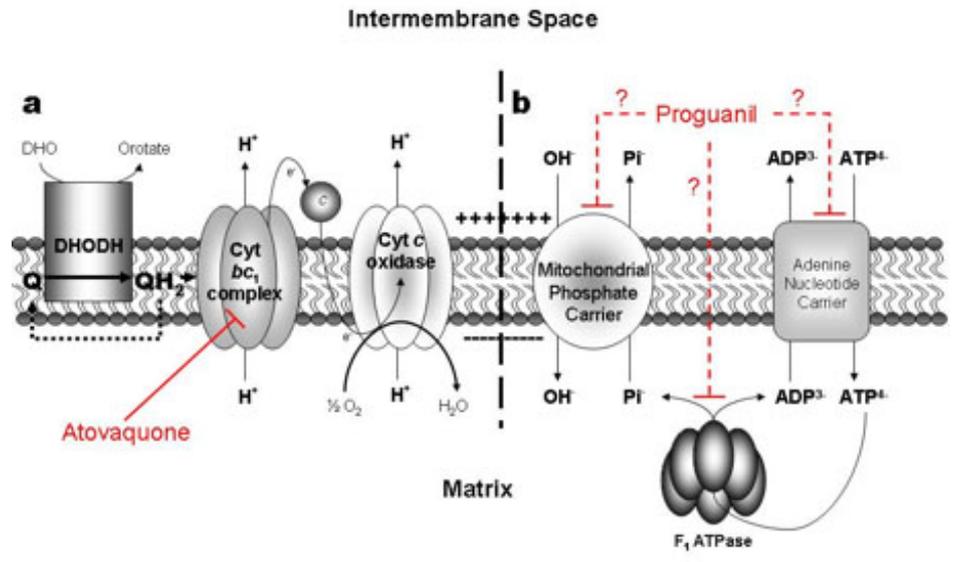


Figure 38 : Chaîne respiratoire de la mitochondrie et action de l'atovaquone.

(Painter, Morrissey, Mather, & Vaidya, 2007)

L'atovaquone possède une efficacité lente, mais reste un antipaludique très efficace et actif contre les stades hépatiques du parasite. Néanmoins, le parasite peut développer aisément une résistance *de novo* contre ce médicament. Le séquençage des souches résistantes a permis de mettre en évidence des mutations clés dans la séquence codant pour le cytochrome b du parasite. Des mutations du cytochrome b à des positions spécifiques (M133I, L144S, L271V, K272R, Y268C, Y268S, Y268N, et V284F) rendent les parasites résistants à l'atovaquone (Siregar et al., 2015).

Mode d'action proposé du bMD1c

Cette hypothèse du mode d'activation du bMD1c (benzylMD1c, figure 39) est basée sur des résultats biochimiques réalisés *in vitro* sur des enzymes recombinantes (Bielitza et al., 2015a). Nous avons tenté de confirmer ce mode d'action *in vivo* dans le parasite.

Rapidement, le bMD1c est supposé pénétrer dans l'érythrocyte hôte, y subir une première oxydation pour former le premier dérivé, le benzoylMD 2c. Ce dérivé serait capable d'entrer dans le cycle catalytique de la glutathion réductase (GR) humaine et parasitaire accompagné de la consommation du NADPH pour donner la forme réduite, le benzoylMD3c réduit. Ce composé serait capable d'interagir

avec la méthémoglobine (metHb(Fe^{3+})) et de la réduire par transfert d'électron pour obtenir l'oxyhémoglobine (oxyHb(Fe^{2+})), indigeste pour le parasite. Au cours du cycle, la benzoylMD3c revient à sa forme oxydée benzoylMD2c (Bielitz et al., 2015a; Ehrhardt et al., 2016; Müller et al., 2011). Le cycle d'oxydation/réduction du benzoylMD2c avec la GR est continu, tant que les réactifs sont présents, notamment le cofacteur de l'enzyme cible, le NADPH. Afin de tester ce modèle, Katharina Ehrhardt a mené *in vitro* sur *P. falciparum* des études de combinaison de bMD1c avec des inhibiteurs spécifiques d'enzymes a priori impliquées dans le mode d'action.

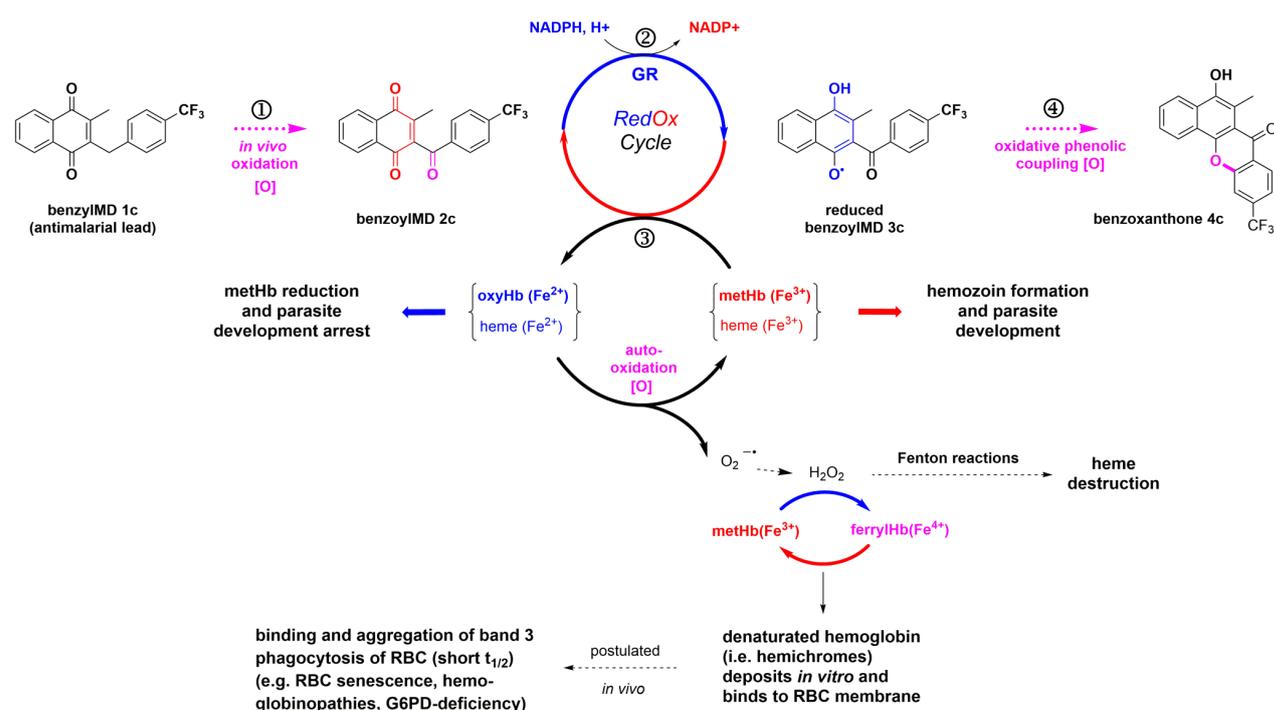


Figure 39 : Schéma théorique et partiel du mode d'action supposé du bMD1c. En bleu sont représentés les réactions de réduction et en rouge celles d'oxydation (Müller et al., 2011).

Combinaison d'inhibiteurs et bMD1c *in vitro*

Le mode d'action du bMD1c est basé sur la rupture de l'équilibre redox du parasite maintenu par le métabolisme du glutathion. Pour confirmer cette hypothèse des composés ont été sélectionnés pour leur capacité à influencer le niveau de glutathion dans le parasite. Ils ont ensuite été utilisés *in vitro* sur *P. falciparum* en plus du bMD1c par Katharina Ehrhardt (figure 40).

- Le benzylMD7a est un dérivé fluoré du bMD1c et un substrat suicide de la GR. En utilisant ce composé la GR de l'hôte et du parasite est inhibée de façon irréversible. On s'attend à ce que les parasites deviennent moins sensibles au bMD1c en présence du benzylMD7a, car la quantité d'enzyme cible diminue. L'interaction obtenue est légèrement antagoniste.
- Le ML276 est un inhibiteur de la Glucose-6-phosphate dehydrogenase-6-phosphogluconolactonase (GluPho). Cette enzyme est le principal producteur de NADPH dans le parasite. La GluPho catalyse deux étapes dont la première régénère le NADPH dans la voie pentose phosphate. C'est cette première étape qui est inhibée par le ML276. Cependant le ML276 présente un site accepteur de Michael qui peut réagir avec de nombreuses protéines thiols dans le parasite. On s'attend donc à ce que les parasites deviennent moins sensibles au bMD1c en présence de ML276 car la quantité de cofacteur de la GR (et des autres flavoenzymes) est réduite. Or, l'interaction est indifférente. Le type d'inhibition du ML276 n'est pas renseigné par la littérature. Lors de tests enzymologique *in vitro*, la régénération du NADPH est inhibée par le produit de la réaction. La présence du site accepteur de Michael peut conduire à des adduits avec différentes protéines. C'est-à-dire que l'inhibiteur n'est pas forcément ultra-spécifique à une enzyme (Mangravita-novo et al, 2013).
- L'amodiaquine et l'acétaminophène déplètent la cellule de son stock de glutathion (Moore et al, 1985; Tingle et al, 1995). Dans ce cas, l'ajout de bMD1c inhibe la GR qui, au lieu de réduire le GSSG devrait augmenter encore plus le stress oxydatif du parasite. On s'attend donc à ce que les parasites deviennent plus sensibles au bMD1c en combinaison avec l'un de ces composés. En d'autres termes, moins il y a de GSH, moins il y a de recyclage de GSSG en GSH, ce qui augmente de stress oxydatif en présence de bMD1c. Or, le phénotype est indifférent. La présence d'un dépléteur de GSH ne rend pas les parasites plus sensibles au bMD1c.
- Le buthionine sulfoximine (BSO) est un inhibiteur de la γ GCS parasitaire, première enzyme de la synthèse *de novo* du glutathion (Luersen et al, 2000; Meierjohann et al, 2002). La production de GSH dans ce cas n'est donc assurée que par le recyclage du GSSG par la GR et éventuellement

par l'import de GSH à partir de la cellule hôte. Si bMD1c est utilisé avec du BSO, on s'attend à ce que les parasites deviennent plus sensibles. Or le phénotype est indifférent.

- La N-acétyl-cystéine est utilisée dans la synthèse du glutathion. Son ajout dans le milieu de culture du parasite entraîne une augmentation du niveau de glutathion (revue Rushworth & Megson, 2014). On s'attend à ce que les parasites soient autant ou moins sensibles au bMD1c en combinaison avec de la N-acétyl-cystéine. Le phénotype est antagoniste.
- La fosmidomycine est un antibiotique ciblant l'enzyme 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase (DOXR) de la voie du méthylérythritol phosphate (ou MEP/DOXP). Cette flavoenzyme est essentielle chez *P. falciparum*. La fosmidomycine a été testée afin de trouver de partenaire de bithérapie au bMD1c. Lorsque les deux composés sont présents dans le milieu, ils deviennent antagonistes l'un avec l'autre. Deux types d'interactions sont possibles : soient ils pourraient être en compétition sur la DOXR, donc avoir la même cible soit la DOXR est nécessaire ou impliquée à l'activation ou l'activité du bMD1c, en plus de la GR.
- La dihydroartémisinine (DHA) est le dérivé actif de l'artémisinine et le standard pour le traitement médicamenteux du paludisme. Son mode d'action est encore obscur mais cette famille de composés perturbe l'équilibre redox du parasite. On s'attend à une synergie entre les deux composés car ils augmentent tous les deux le stress oxydatif du parasite. Une synergie est observée, ce qui ferait du bMD1c et de la DHA de bons partenaires de bithérapie.
- L'atovaquone (Ato) utilisé dans la Malarone®, inhibe le cytochrome bc de la chaîne respiratoire de la mitochondrie. Cet antipaludique a un mode d'action qui a été prouvé différent de celui du bMD1c (Ehrhardt et al., 2013a). Il a donc été choisi comme contrôle positif des essais. Le phénotype attendu est celui observé, indifférent lorsque ces deux antipaludiques sont introduits dans le milieu de culture du parasite.
- Le bleu de méthylène (MB) sous sa forme leuco-bleu de méthylène, réduit la méthémoglobine et inhibe la GR de façon non compétitive, déplaçant le

parasite de son GSH (Buchholz et al., 2008; Ehrhardt et al., 2013b; Färber, Arscott, Williams, Becker, & Schirmer, 1998). Cet antipaludique est supposé avoir un mode d'action similaire au bMD1c et effet additif est observé.

Composés testés en combinaison avec le bMD1c		Interaction <i>in vitro</i>
Activité de la GR		
benzylMD7a	Substrat suicide de la GR	Légèrement antagoniste
Balance de NADPH du iRBC		
ML276	Inhibiteur de la <i>PfGluPho</i>	Indifférent
Balance de GSH du iRBC		
Amodiaquine	GSH dépléteur	Indifférent
Acétaminophène	GSH dépléteur	Antagonisme
BSO	Inhibiteur de la γ GCS	Indifférent
N-acétyl-cystéine	Précurseur de la synthèse de γ GSH	Antagonisme
Combinaison à d'autres antipaludiques		
Fosmidomycine	Antibiotique inhibiteur de la DOXR	Antagonisme
Dihydroartémisinine	Dérivé de l'artémisinine, rupture de l'équilibre redox	Synergie
Atovaquone	Hydroxy-1,4-naphtoquinone, inhibiteur du cytb	Indifférent
Bleu de méthylène	Chlorure de méthylthionium, GSH dépléteur et inhibiteur de la <i>PfGR</i>	Indifférent

K.Ehrhardt, 2014

Figure 40 : Interaction *in vitro* entre des antipaludiques et bMD1c. Ces essais ont été réalisés sur une souche *P. falciparum* 3D7. BSO : buthionine sulfoximine ; GR : glutathion réductase ; iRBC : érythrocyte infecté ; *PfGluPho* : Glucose-6-phosphate dehydrogenase-6-phosphogluconolactonase de *P. falciparum* ; GSH : glutathion ; γ GCS : γ -glutamylcysteine synthetase ; DOXR : 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase ; cytb : cytochrome b.

Les résultats de ces tests de combinaison renseignent sur les mécanismes proposés. Ils permettent aussi de déterminer les pistes pour l'invalidation de gènes d'intérêts chez *P. berghei*. Cette invalidation génétique chez *P. berghei*, plus facile à manipuler génétiquement, permettra de confirmer ou non le modèle décrit plus haut.

Le substrat suicide de la GR s'est montré légèrement antagoniste au bMD1c. Cela va dans le sens du mode d'action hypothétique avec la GR comme cible du bMD1c. Mais ces deux composés appartiennent à la même famille. Afin de confirmer ces résultats, nous avons utilisé un mutant chez *P. berghei* invalidé complètement pour la GR (*PbGR^{-/-}*) et réalisé dans un background exprimant la GFP (Pastrana-Mena et al., 2010). Ce mutant sera nommé Δ GR par la suite.

L'interaction avec l'inhibiteur de la GluPho est indifférente. L'inhibiteur chimique ne permet peut être pas une inhibition de l'enzyme *in vivo*. C'est pourquoi l'invalidation génétique de l'enzyme est intéressante. La GluPho est une enzyme essentielle chez *P. falciparum* et les mutants *PfGluPho^{-/-}* ne sont pas viables (Jortzik et al., 2011). Intéressés par le rôle clé de cette enzyme (production de cofacteur NADPH pour l'enzyme supposée cible), nous avons voulu créer ce mutant chez *P. berghei*. Ce mutant sera nommé Δ GluPho dans la suite de cet énoncé.

L'épuisement des stocks de GSH par un des composés testés en parallèle de bMD1c donne un phénotype antagoniste (acétaminophène et N-acétyl-cystéine) ou indifférent (amodiaquine et BSO). Si la synthèse de GSH est inhibée et le recyclage ne se fait pas car la GR cycle avec le bMD1c (au lieu du GSSG), nous nous attendions à une synergie. L'effet indifférent de la combinaison BSO + bMD1c suggère que la déplétion en GSH seule n'explique pas la mort du parasite. Nous voulions vérifier cette hypothèse avec une invalidation de la voie de synthèse du GSH. Cette voie comptant deux enzymes, la γ -glutamylcystéine synthétase (γ GCS) en aval de la glutathion synthétase (GS). Pour la γ GCS, un mutant chez *P. berghei* invalidé complètement (*Pb γ GCS^{-/-}*) dans une souche exprimant la GFP qui existait déjà (Pastrana-Mena et al., 2010). Pour la GS, nous avons dû créer un nouveau mutant (*PbGS^{-/-}*). Ces mutants seront nommés $\Delta\gamma$ GCS et Δ GS, respectivement.

L'antagonisme de la fosmidomycine avec le bMD1c indique que l'activation/action du bMD1c pourrait être liée à la DOXR. Nous avons donc entrepris la construction d'une souche invalidée génétiquement pour la DOXR chez *P. berghei*.

LA SYNTHÈSE DE NOVO DU GSH ET DU NADPH

Le bMD1c est proposé entrer dans le cycle redox de la GR de façon continue tout en consommant une molécule de NADPH à chaque cycle (Bielitza et al., 2015b). Le parasite se retrouve (i) avec un stock de NADPH épuisé et (ii) dans impossibilité de réduire son GSSG par la GR parasitaire. La production de GSH chez le parasite repose donc entièrement sur la synthèse *de novo*. En suivant ce raisonnement, les enzymes clés sont : (i) la GluPho, principale productrice de NADPH dans le parasite ; (ii) la GR parasitaire, une cible potentielle du bMD1c ; (iii) la GS et la γ GCS, enzymes de la synthèse *de novo* du GSH.

Chez *P. berghei* des enzymes invalidés pour la GR et la γ GCS existaient déjà (Pastrana-Mena et al., 2010), nous avons décidé d'invalider chez *P. berghei* les autres enzymes clés, GS et GluPho afin de compléter les parasites mutants disponibles pour valider le modèle d'action proposé de bMD1c. Ces invalidations génétiques permettent de tester ces enzymes sans aucun autre composé dans le milieu qui pourrait interférer (biais qui aurait pu intervenir dans l'étude de combinaison de composés).

LA VOIE NON-MEVALONATE (MEP)

Presque tous les organismes du genre *Apicomplexa*, y compris *P. falciparum*, synthétisent les isoprénoïdes exclusivement par la voie dite non-mévalonate. Les isoprénoïdes ou terpénoïdes, sont une classe de composés très large pouvant générer des réactions métaboliques très variées mais assurant des fonctions vitales pour les cellules telles que la respiration aérobie (ubiquinone) ou la stabilisation de la membrane (cholestérol). Les isoprénoïdes sont également présents chez les plantes et sont exploités en tant que parfum, additif alimentaire ou agent pharmaceutique, notamment l'artémisinine (Odom, 2011).

La voie non-mévalonate débute par la synthèse de déoxyxylulose 5-phosphate (DOXP) depuis une molécule de pyruvate. Ce produit est transformé par la 1-déoxy D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase (DOXR) en méthylerythritol 4-phosphate (MEP), dont dérive le nom de la voie. La voie du MEP étant linéaire, chaque enzyme est essentielle car cette voie est nécessaire pour la synthèse *de novo* des isoprénoïdes. De plus, chez *P.falciparum* les isoprénoïdes sont

synthétisés uniquement par cette voie (Odom, 2011), rendant la DOXR essentielle (Garg et al., 2015).

La *Pf*DXR est la cible de la fosmidomycine (Garg et al., 2015). Or la fosmidomycine et le bMD1c sont antagonistes sur *P. falciparum* selon les études de combinaison de composés *in vitro*. Il se pourrait que ces deux composés ciblent la même enzyme, la DOXR ou que la fosmidomycine inhibe une voie essentielle pour l'activation/activité du bMD1c. Nous avons donc décidé de générer un mutant *P. berghei* invalidé pour la DOXR afin (i) de vérifier si la liaison du mode d'activation/action du bMD1c sur la DOXR et (ii) de tester cette enzyme sans autres composés pouvant interférer (biais qui aurait pu intervenir dans l'étude de combinaison de composés).

Le Plasmodium Genetic Modification Project (PlasmoGEM)- Saenger institut

Le projet PlasmoGEM est une organisation à but non lucratif, qui met à disposition des outils génétiques pour la modification du génome des parasites *Plasmodium*. Le projet avait d'abord pour but de produire des vecteurs d'ADN ciblant tous les gènes de *P. berghei*. Les techniques utilisées sont basées sur la technologie Gateway qui permet de convertir des bibliothèques génomiques en vecteurs ciblant des gènes d'intérêts par de longues séquences d'homologie (figure 41) et qui s'intègrent avec une grande efficacité (Pfander et al., 2011).

PlasmoGEM KO vector design

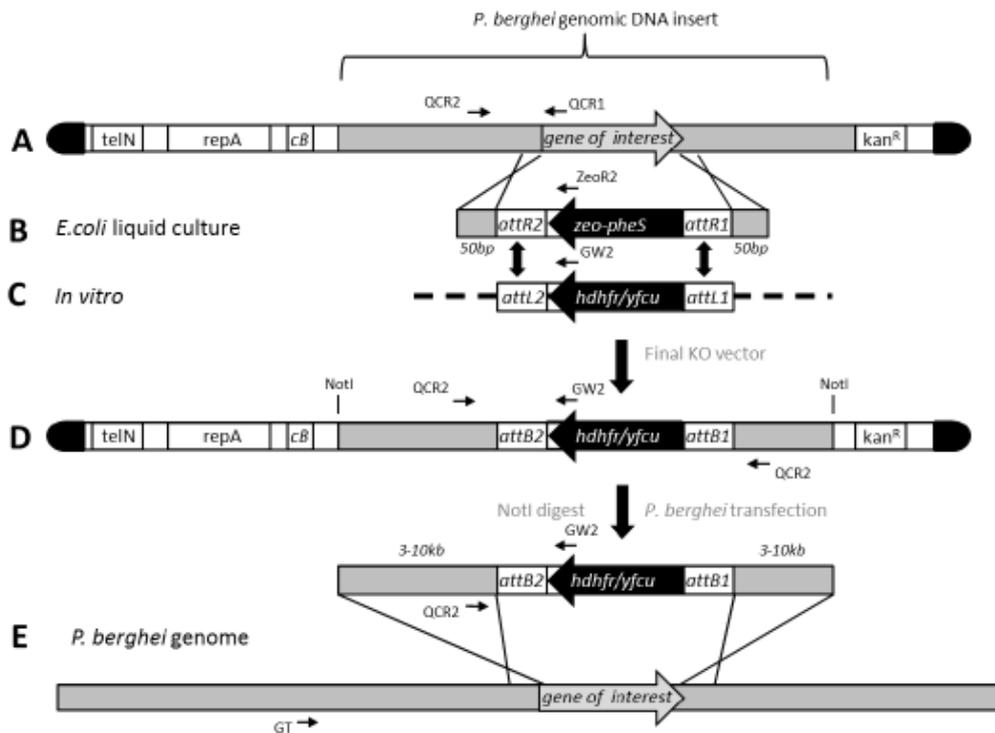


Figure 41 : Représentation schématique de la génération de vecteurs recombinants pour invalider un gène d'intérêt pour *P. berghei* par interruption du gène. (A) Schéma du vecteur linéaire pJAZZ sur lequel on observe : les télomères en épingle à cheveux (représentés en noir), le gène de la télomérase (TelN), le facteur de réplication est l'origine (repA), et le gène de résistance à la kanamycine (kan^R). L'insert d'ADN génomique contient le gène d'intérêt (gene of interest). (B) le gène d'intérêt est remplacé par une cassette bactérienne (zeo-pheS) par recombinaison homologue (50pb flanquées de chaque côté de la cassette). (C) Lors d'une réaction *in vitro* Gateway, la cassette bactérienne zeo-pheS est remplacée par la cassette de sélection pour *P. berghei* hdhfr/yfcu possible par le site d'association attR flanqué autour du marqueur zeo-pheS et du site attL flanqué autour de la cassette hdhfr/yfcu. (D) Avant la transfection, le vecteur complet ciblant le gène d'intérêt est digéré par l'enzyme NotI, qui retire les parties modifiées de l'insert de l'ADN génomique de *P. berghei*. (E) Suite à la transfection, le vecteur invalide le gène d'intérêt par insertion de la cassette hdhfr/yfcu par recombinaison homologue.

Les plasmides servant à invalider les trois enzymes d'intérêt ont été commandés à PlasmogEM, puis amplifiés et purifiés à l'IBMC. Ils ont été envoyés à Leiden où Blandine Franke-Fayard et son équipe ont réalisé la transfection des parasites et l'obtention de mutants.

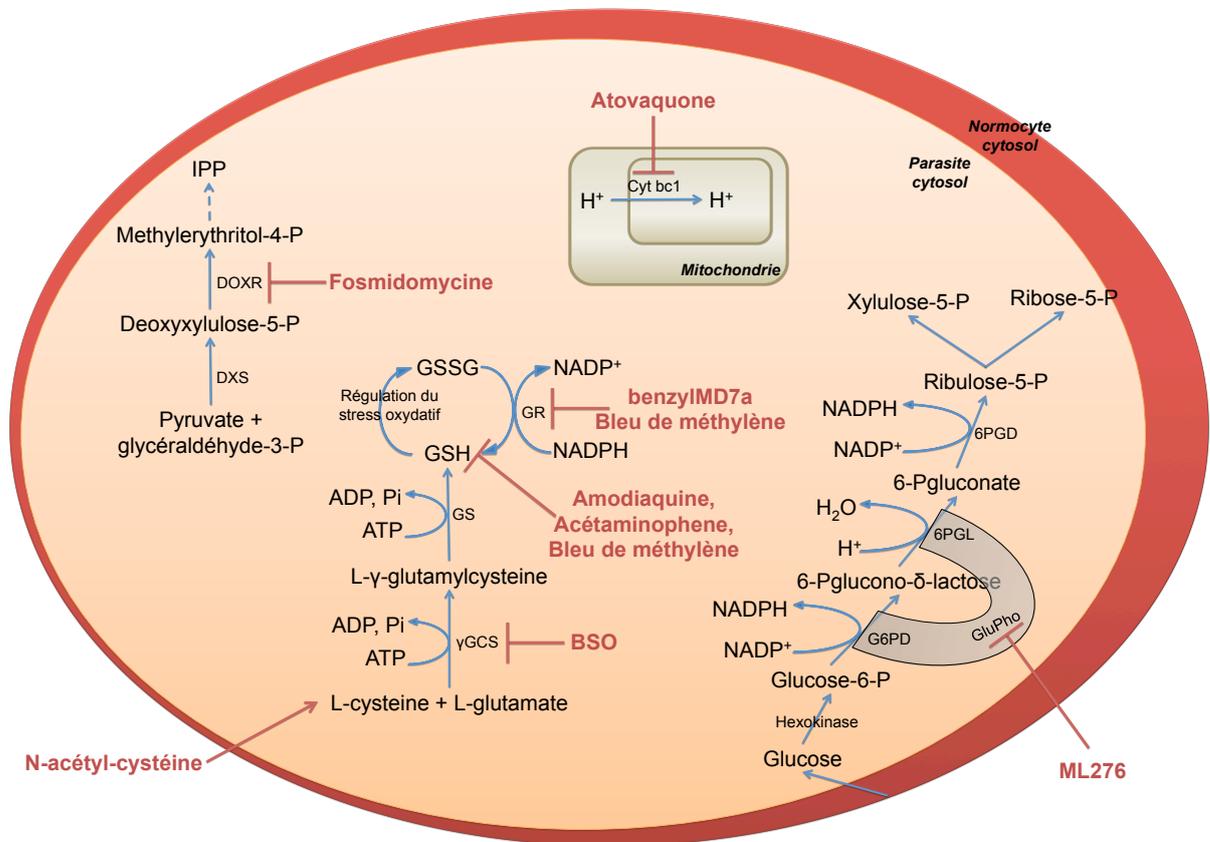


Figure 42 : Représentation schématique des inhibiteurs d'enzyme et autres composés utilisés sur *P. falciparum* *in vitro*

Matériel et méthode du chapitre 3

Design des mutants

PlasmoGEM est un service de l'Institut Sanger qui produit et distribue gratuitement des outils de manipulations génétiques pour les parasites *Plasmodium berghei*. Nous avons commandé des vecteurs de transfection pour nos 3 enzymes d'intérêts : la 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase (DOXR), la glutathione syntéthase (GS) et la glucose-6-phosphate dehydrogenase-6- phosphogluconolactonase (G6PD-6PGL ou GluPho).

PBANKA_131750 = PbGEM-105499 = invalidation pour la GluPho

PBANKA_133060 = PbGEM-106603 = invalidation pour la DOXP

PBANKA_111180 = PbGEM-041695 = invalidation pour la GS

Les trois vecteurs de transfection arrivent sous forme de bactérie *E. Coli* low copy contenant le plasmide d'intérêt. Le plasmide est linéaire (pJAZZ) contenant notamment une cassette de résistance à la kanamycine. Une première mini-préparation est réalisée, suivie d'une maxi-préparation. Le plasmide obtenu par amplification des bactéries est purifié avec le kit NucleoBond Xtra midi Plasmid DNA Purification (Macherey Nagel). Le produit de cette purification est digéré avec l'enzyme NotI afin de ne récupérer que l'insert flanqué des deux régions homologues au gène d'intérêt chez *P berghei* puis amplifié par réaction en chaîne par polymérase (PCR) avec l'enzyme GoTaq selon le programme et les primeurs suivants : 95° 5' ; (95° 30" ; 50° 30" ; 68° 1') x30 ; 68° 10' 4° oo

GW2 (similaire pour les 3 plasmides) : ctttggtgacagatactactgtgttta ; QRC(GS) : attggcatataccgcacattta ; QRC(GluPho) : gtattgaacgccgatagtttt ; QRC(DOXR) : tccagcatgataagccaatttt.

Le produit de la PCR est isolé par précipitation à l'éthanol.

La transfection dans les parasites a été réalisée par Blandine Franke-Fayard du Malaria Research Group, LUMC (Leiden, Hollande) selon le protocole de sélection des parasites transformés par FACS décrit dans le papier (Janse, Franke-fayard, & Waters, 2006). Un northern blot a été réalisé sur les parasites obtenus pour le

knock out de la GS et de la GluPho (pas de parasite obtenu pour le plasmide ciblant la DOXR) avec les sondes suivantes : GS (i) Primer_F : tgctcggatcatgtaaggaaa ; Primer_R : ttcttgtagcaaaagggaataa et GluPho : Primer_F : tggaacacccatgccaattta ; Primer_R : ccatttggaaggatttga

Élevage des moustiques

Les moustiques *Anopheles gambiae* de souche G3 sont élevés à l'IBMC selon la procédure décrite dans la publication (Richman et al., 1997).

Élevage des souris

L'élevage et les expérimentations animales décrites dans cette partie, ont été réalisées à l'Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire (Strasbourg, France) dans des installations et selon des protocoles approuvés par la législation française pour le bien être animal. Le projet (04480.02) et le bâtiment (numéro d'agrément de l'institut F674822) ont été approuvés par les autorités françaises.

Passage du parasite Plasmodium berghei

Les souris CD1 sont infectées par le parasite *Plasmodium berghei* de la souche ANKA de type wild type (wt) et mutants et exprimant de façon constitutive la GFP (Green Fluorescent Protéine) ou la GFP-luciférase. Pour passer le parasite d'une souris à l'autre, une ponction cardiaque est réalisée sur une souris donneuse avec une parasitémie entre 3-5%. Le sang collecté est dilué dans du PBS fin d'obtenir une concentration de 10^8 érythrocytes infectés/mL. 0.2mL de ce mélange sont injectés à une souris donneuse par voie intravéneuse. La parasitémie de la souris est suivi par cytométrie (FACSCalibur™, BD Bioscience) ou par frottis sanguin coloré au Giemsa.

Mesure de l'exflagellation des mâle gamétocytes

L'exflagellation des gamétocytes mâles est induite par un changement rapide de pH et de température. Entre lame et lamelle, 5µL de sang infecté avec le parasite fluo-frmg (RMgm-164) sont mélangé à 5µL de milieu de oocynète RPMI 1640 contenant de la L-glutamine, 25mM HEPES, 0.85g/L NaHCO₃, 50mg/L Néomycine dans 10% de sérum de veau foetal à pH 8 à une température de 21°C

pendant 15min. Puis le nombre de mâle en exflagellation est compté ainsi que le nombre d'érythrocytes présents dans le champ du microscope. Un suivi par cytométrie, permet de détecter le nombre mâles gamétocytes présents dans le même échantillon. Cela permet d'obtenir le pourcentage de mâle gamétocytes en exflagellation sur le nombre d'érythrocytes relatif au pourcentage de mâle en gamétocytes sur le nombre d'érythrocytes, soit le pourcentage de gamétocytes mâles fonctionnels.

Capacité d'un composé à bloquer de la transmission in vivo

La parasitémie des souris est mesurée quotidiennement par cytométrie (FACSCalibur™, BD Bioscience) ou par smears. En parallèle, des groupes de 40 femelles *Anopheles gambiae* (adultes de 4-7 jours) prennent un repas sanguin sur les souris infectées 2 jours post passage (un groupe de 40 femelles moustiques par souris). Pour cela, les souris sont anesthésiées par injection i.p. de 5% Rompun® (Xylazine) et 10% Imalgène® (Ketamine) diluée dans du PBS (100 µl pour 10 g de souris) puis exposées aux piqûres de moustiques pendant 15 minutes. Seules les femelles qui se sont gorgées sont conservées pendant 7 jours avant d'être disséquées dans du PBS pour récupérer leur intestin. Chaque intestin est photographié au microscope à fluorescence Nikon AZ100 et les parasites fluorescents sont comptés sur image avec le programme watershed. La prévalence (pourcentage de moustiques infectés) et la charge parasitaire (nombre moyen de parasites dans chaque intestin infecté) sont représentées en graph avec le logiciel Prism. Trois expériences indépendantes ont été menées et la significativité des traitements, du temps et des répétitions a été calculée avec un « generalized linear models » du software JMP® software (SAS).

Inhibition de la maturation de Plasmodium berghei in vitro pour les mutants exprimant la luciférase

La sensibilité des stades asexués de *P berghei* aux composés bMD1c et d'autres antipaludiques a été déterminée en mesurant l'activité de la luciférase de parasites l'exprimant constitutivement après une incubation de 24h *in vitro* avec différentes concentrations de composé. Le sang de la souris infectées (parasitémie 1-3%) est collecté par ponction cardiaque et lavé à deux reprises

dans du milieu RPMI 1640 à 25% de sérum de veau fœtal (SVF). Le sang lavé est resuspendu dans ce même milieu à une hématocrite de 4% et exposé pendant 24h à une dilution de bMD1c, bMD40 ou d'autres antipaludiques de référence. Pour cela, les composés sont dissous dans du DMSO ou de l'eau respectivement à une concentration de 6mM (bMD1c, bMD40 et CQ) ou de 10mM (MB, Ato, DHA) avant d'être dilué dans du milieu de culture à 300 ou 100µM suivi d'une dilution en cascade de 1 : 3. Au final, 50µL de ces solutions sont réparties en triplicatas dans une plaque 96 puits noire contenant 50µL de sang à 4% hématocrite (hématocrite finale de 2%). La plaque est incubée pendant 24h à 37°C dans une atmosphère à 5% O₂, 5% CO₂, et 90% N₂, puis centrifugée 1min à 1900 rpm, le surnageant est retiré avant de congeler les plaques à -80°C. Les plaques congelées à -80°C sont incubées à 37°C pendant au moins 30min. les cellules sont lysées à température ambiante avec 10µL de 1x luciferin lysis buffer (Luciferase Cell Culture Lysis 5x reagent, Promega). Les plaques sont ensuite lues sur le fluorimètre à microplaques GloMax®-multi à un injecteur pour 100µL de luciferase assay substrate (Luciferase Assay System, Promega) par le programme Luciferase Assay System, Promega. Une seconde lecture est réalisée avec le programme BrightGlo (lecture en balayage sans ajout de composé) à la fin du premier programme, pour la vérification des variations intra-plaque. La moyenne de chaque triplicata est calculée puis normalisée selon la formule : $(Luc_x - Luc_{RBC}) / (Luc_{solvent} - Luc_{RBC})$ avec Luc_x et $Luc_{solvent}$ = moyenne de l'activité luciférase pour les parasites incubés avec le composé x et le solvant (DMSO ou PBS), et Luc_{RBC} = moyenne de l'activité luciférase sur les érythrocytes non infectés (background). Les valeurs d'IC₅₀ ont été calculées avec le logiciel Prism (GraphPad, log(inhibitor) vs. normalized response – variable slope) pour 3 expériences différentes pour l'essai sur les gamétocytes *P falciparum* et 5 pour l'essai sur les stades asexués de *P berghei*.

Inhibition de la maturation de Plasmodium berghei in vitro pour les mutants exprimant la GFP seule

La sensibilité des stades asexués de *P berghei* aux composés bMD1c et d'autres antipaludiques a été déterminée en mesurant l'activité de la quantité de parasite ayant mûris en schizont après une incubation de 24h *in vitro* avec différentes

concentrations de composé. Si les parasites ne sont pas strictement synchronisés, ils présentent une tendance à réenvahir vers minuit-1h et donc en anneaux très tôt le matin et la maturation en schizont se fait la journée.

Le sang de la souris infectées (parasitémie 3-5%) est collecté par ponction cardiaque (à réalisé absolument tôt le matin avant 9 a.m.), lavé à deux reprises dans du milieu RPMI 1640 à 25% de sérum de veau foetal (SVF). Le sang lavé est resuspendu dans ce même milieu à une hématocrite de 4% et exposé pendant 24h à une dilution de bMD1c, bMD40 ou d'autres antipaludiques de référence. Pour cela, les composés sont dissous dans du DMSO ou de l'eau respectivement à une concentration de 6mM (bMD1c et CQ) ou de 10mM (MB, Ato, DHA) avant d'être dilué dans du milieu de culture à 300 ou 100 μ M suivi d'une dilution en cascade de 1 : 5. Au final, 50 μ L de ces solutions sont réparties en triplicatas dans une plaque 96 puits contenant 50 μ L de sang à 4% hématocrite (hématocrite finale de 2%). La plaque est incubée pendant 24h à 37°C dans une atmosphère à 5% O₂, 5% CO₂, et 90% N₂. 10 μ L d'une solution de Hoechst (1 : 300) est ajouté dans les 100 μ L de culture (1 : 3000 final) qui sont resuspendus et incubé pendant 30min dans le noir. 10 μ L de culture contenant du Hoechst sont dilués dans 200 μ L de PBS sont ajoutés dans une plaque 96 puits a fond U. la plaque est lue par cytométrie (MACSQuant flow cytometer, Miltenyi Biotec (INCI)). La moyenne de chaque triplicata est calculée puis normalisée selon la formule : $(FACS_x)/(FACS_{solvent})$ avec $FACS_x$ et $FACS_{solvent}$ = moyenne de la population de schizont matures mesuré par cytométrie pour les parasites incubés avec le composé x et le solvant (DMSO ou PBS) (figure 43). Les valeurs d'IC₅₀ ont été calculées avec le logiciel Prism (GraphPad, log(inhibitor) vs. normalized response - variable slope).

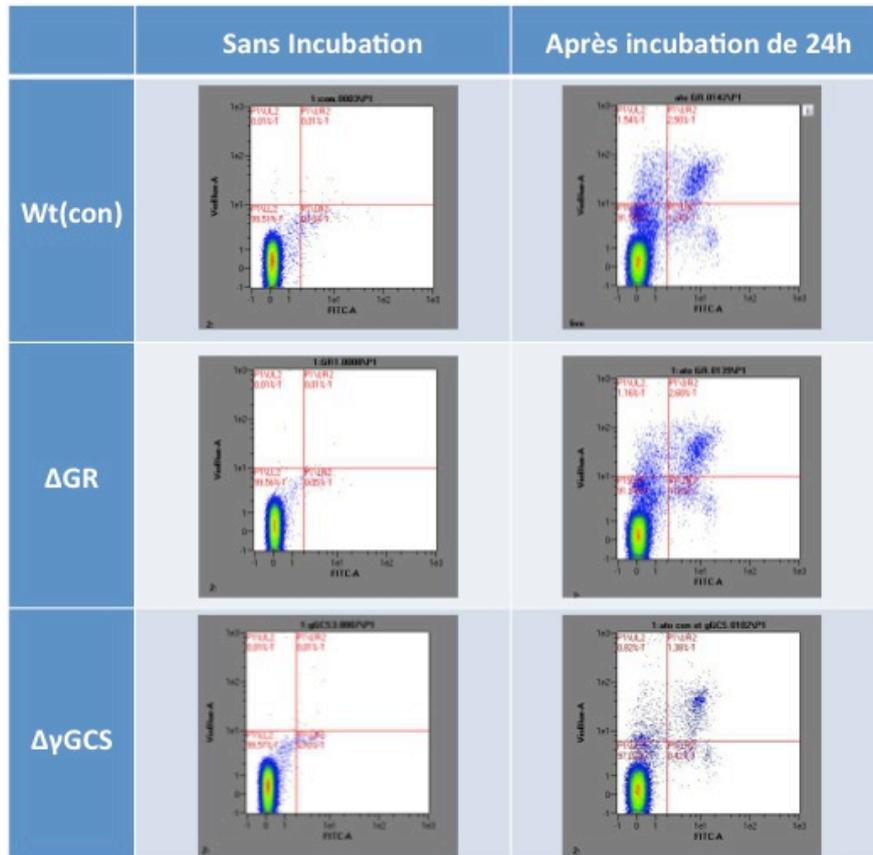


Figure 43 : Profils de cytométrie représentatifs des parasites +/- incubations. Lors du prélèvement (9a.m.) les parasites sont majoritairement au stade anneaux et après incubation *in vitro* sans traitement, la majorité des parasites ont mûri en schizontes.

Séquençage du gène *cytb* des parasites *Pb*

Un mL de sang a été collecté par ponction cardiaque chez une souris infectée avec un des parasites suivants : PbGFPluc, ΔGS ou ΔGluPho. L'ADN génomique des parasites est extrait avec le kit Quiagen DNease Blood and Tissue Kit selon le protocole du fabricant avec une élution dans une solution de 10mM TRIS.

La séquence du gène *cytB* est amplifiée par PCR avec la paire de primers suivants sur : TGGTGCATCACTTGTATTTTCTTA et GGATAGGATGTCAATTACCACAAGA. Le produit de la PCR (650-800 bp selon les séquences) est envoyé pour séquençage à la compagnie GATC avec le protocole de light run accompagné des primers précédents.

Résultats du chapitre 3

Design des parasites Plasmodium berghei invalidés génétiquement pour la GS et la GluPho

Les transfections des plasmides ciblant la GS et la GluPho ont générés des parasites dont le stade érythrocytaire est viable. Aucun ARN codant pour la GS ou la GluPho n'a été détecté dans les mutants invalidés pour la GS ou la GluPho (figure 44), confirmant l'obtention des mutants. Nous les nommons Δ GS et Δ GluPho. La synthèse *de novo* du GSH n'est pas essentielle chez *P. berghei* pour les stades érythrocytaires. En effet, un mutant invalidé pour la γ GCS, l'enzyme en aval de la GS, avait déjà été crée (Pastrana-Mena et al., 2010). Le fait que le parasite *P. berghei* invalidé pour la GS soit également viable à ce stade était donc attendu, la GS intervenant après la γ GCS. À noter, ce n'est pas le cas chez *P. falciparum* où l'inactivation de la γ GCS ou de la GS n'est pas viable (Jortzik & Becker, 2012b). *P. berghei* possède donc des mécanismes de compensation pour se développer sans ces enzymes clés. Il a été montré que lorsque la GR ou la γ GCS sont invalidées, *P. berghei* est capable d'importer le GSH de l'érythrocyte hôte afin de compenser son niveau total de GSH (Patzewitz et al., 2012).

Par ailleurs, la thiorédoxine réductase (TxR) est capable de compenser l'absence de la GR, lorsque le recyclage du GSH ne se fait plus en réduisant la Trx(S)₂ en Trx(SH)₂ qui de façon non enzymatique peut réduire le GSSG (Kanzok, Schirmer, Tu, & Iozef, 2000; Pastrana-Mena et al., 2010; Pearce et al., 2001). Elle pourrait également palier au non fonctionnement de la synthèse *de novo* en recyclant le GSSG en tandem avec la GR.

Le mutant Δ GluPho est viable chez *P. berghei* au stade érythrocytaire alors que la même invalidation est létale chez *P. falciparum* (Allen et al., 2015).

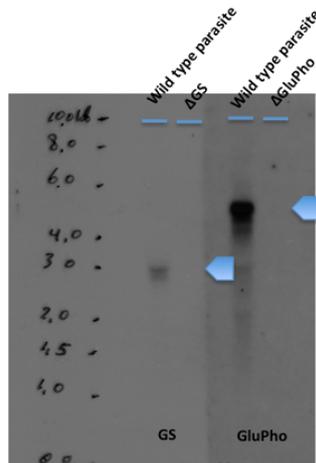


Figure 44 : Northern blot montrant l'inactivation génétique totale chez les parasites Δ GS et Δ GluPho. L'absence d'hybridation avec la sonde chez les deux mutants montre que l'ARN spécifique à GS ou GluPho n'est pas présent chez les parasites invalidés.

La transfection du plasmide ciblant à invalider la DOXR, n'a pas permis la genèse d'un parasite mutant, suggérant que la DOXR est essentielle pour les stades érythrocytaires chez *P. berghei*, en plus de l'être chez *P. falciparum* (Garg et al., 2015). Lorsque l'enzyme est invalidée à ce stade, le développement du parasite s'arrête. Ce résultat conforte le fait que la DOXR est une cible thérapeutique très intéressante pour la création de nouveaux antipaludiques.

Caractérisation des mutants Δ GS et Δ GluPho

Les deux mutants invalidés pour la Δ GS ou la Δ GluPho ont été caractérisés *in vivo*. Leur développement au stade érythrocytaire a été comparé à deux contrôles : le contrôle PbGFPcon [wt(con)], exprimant constitutivement la GFP et le contrôle PbGFPLuc [wt(luc)], exprimant la luciférase fusionnée à la GFP et qui a été utilisé comme background pour la genèse des mutants (Δ GS et Δ GluPho). La présence de la luciférase à la suite de la GFP rend les parasites beaucoup moins fluorescents, la parasitémie est donc suivie quotidiennement par frottis sanguin et non par cytométrie.

La parasitémie des souris infectées avec wt(con) et wt(luc) augmente de façon similaire jusqu'à atteindre un plateau entre 15 et 20% à 4 jours post passage (4

dpp, figure 45). La parasitémie des mutants Δ GS et Δ GluPho n'augmente plus passé 2 jours post passage. Elle reste entre 3.5 à 5% pour la Δ GS et de 2.5 à 3% pour la Δ GluPho. Si l'invalidation de la GS ou de la GluPho n'est pas létale pour les stades érythrocytaires de *P. berghei*, elle limite le développement du parasite.

La gamétocythémie des souris est mesurée à 2 et 3 jours post passage. Les contrôles wt(con) et wt(luc) présentent une gamétocythémie moyenne de 0.8% et 0.5%, respectivement à 2 jours post passage. Malgré une parasitémie moindre, les mutants Δ GS et Δ GluPho présentent une gamétocythémie similaire à celles des contrôles (0.7% à 2 jours post passage, figure 45, B). C'est à 2 jours post passage que les repas sanguin des moustiques se fait.

Avant d'infecter les moustiques, la capacité des mutants Δ GS et Δ GluPho à exflageller a été mesurée. Le même jour (2 jours post passage), au même inoculum, les parasites Δ GluPho et Δ GS exflagellèrent autant que wt(luc) mais moins que les contrôle wt(con) (figure 45 C). Le nombre de gamétocytes mâles exflagellant a été compté par rapport au nombre de globules rouges puis rapporté au contrôle wt(con). La présence de la luciférase à la suite de la GFP semble rendre les gamétocytes mâles moins fonctionnels que ceux des contrôles wt(con). L'invalidation de la GS ou de la GluPho n'affecte pas la fonctionnalité des gamétocytes mâles par rapport à wt(luc).

Nous en déduisons que l'invalidation de ces deux enzymes réduit la capacité du parasite à se multiplier *in vivo*, mais n'affecte pas la production de gamétocytes.

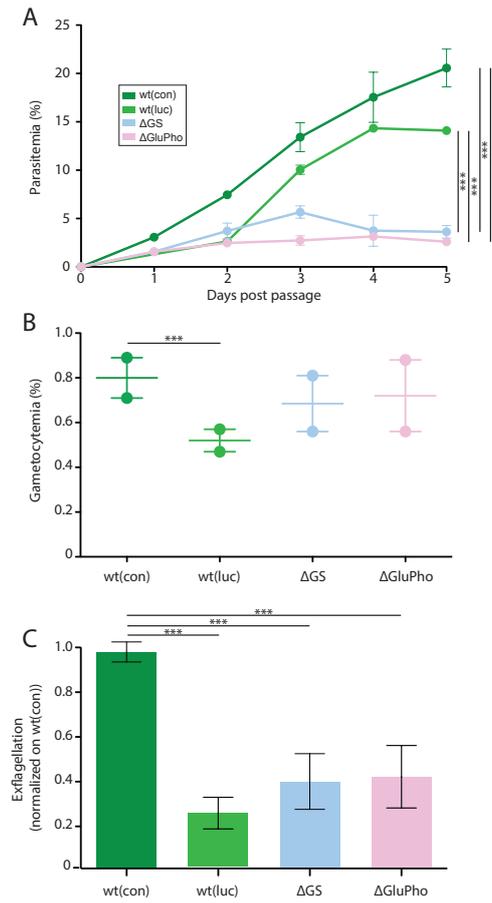


Figure 45 : Caractérisation des parasites mutants Δ GS ou Δ GluPho *in vivo*.
 (A) La parasitémie des souris est mesurée quotidiennement par frottis sanguin.
 (B) Deux jours post passage, la gamétocytemie des souris est également comptée. (C) Ratio des mâles gamétocytes par rapport au contrôle wt(con) capables d'exflageller à 2 jours post passage. Chacune de ces expériences comprend deux souris.

Des groupes de moustiques *A. gambiae* susceptibles reçoivent un repas sanguin de 15min sur des souris infectées avec l'un des 4 parasites wt(con), wt(luc), Δ GS ou Δ GluPho. Sept jours après le repas sanguin, les intestins des moustiques sont disséqués pour observer les oocystes.

Les oocystes du contrôle wt(luc) sont plus petits, beaucoup moins nombreux et moins brillants que les wt(con). Les oocystes des parasites mutants Δ GS et Δ GluPho sont très similaires aux oocystes de wt(luc). Il semblerait donc que la présence de la luciférase à la suite de la GFP affecte le développement du

parasite en oocyste dans le contrôle wt(luc) et les parasites mutés Δ GS et Δ GluPho.

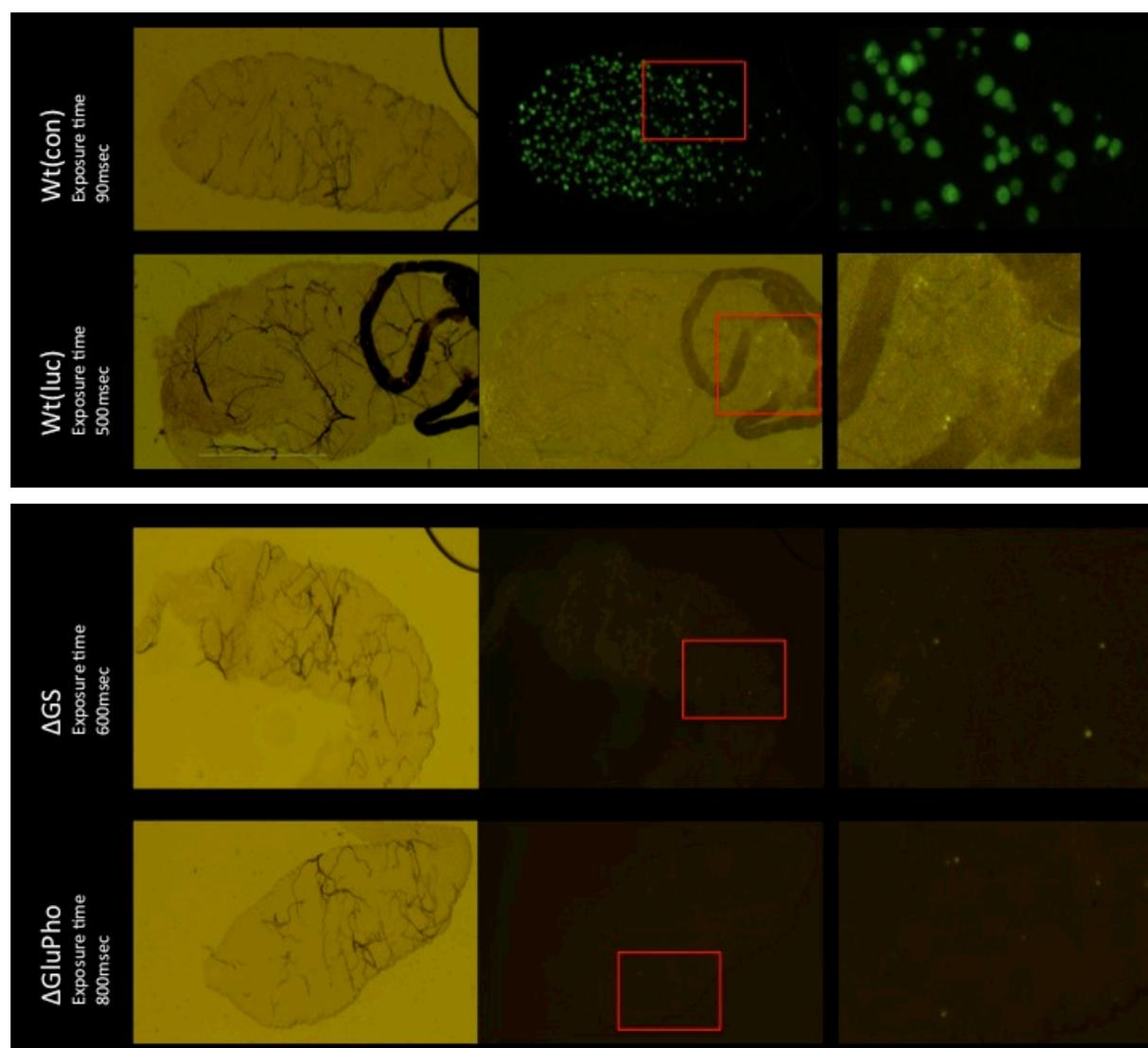


Figure 46 : Photographies de parasites au stade oocyste dans des intestins de moustiques *A. gambiae*. L'infection des moustiques est faite sur souris infectées avec les parasites sauvages PbGFPcon (wt(con)) et PbGFPluc (wt(luc)) ou les parasites mutés Δ GS et Δ GluPho, 2 jours après passage à même inoculum.

La prévalence représente le pourcentage de moustiques s'étant gorgés et portant au moins un parasite dans leur intestin. La charge parasitaire ou niveau d'infection est le nombre de parasites compté pour un intestin de moustique.

La prévalence des parasites wt(con) et wt(luc) est similaires (pas de différences significatives) alors que les mutants Δ GS et Δ GluPho présentent des prévalences

plus basses que les deux contrôles, mais non significatives (figure 47). Le niveau d'infection du wt(con) est significativement plus élevé que celle des wt(luc), Δ GS et Δ GluPho. Cependant, si l'on compare wt(luc), Δ GS et Δ GluPho, leurs niveaux d'infection se situent dans les mêmes ordres de grandeurs : avec une moyenne de 10 parasites par moustique pour le wt(luc) et Δ GluPho et 20 parasites par moustique pour l'infection avec Δ GS. Ces niveaux d'infection sont faibles comparés à ceux de wt(con) avec une moyenne de 100 parasites par moustique. La charge parasitaire est significativement diminuée par l'expression de la luciférase (wt(con) >> wt(luc)). L'invalidation de la GS ou de la GluPho ne réduit pas significativement la charge parasitaire par rapport au contrôle wt(luc). Au contraire, la charge parasitaire de Δ GS est plus élevée que celle de wt(luc) (figure 47).

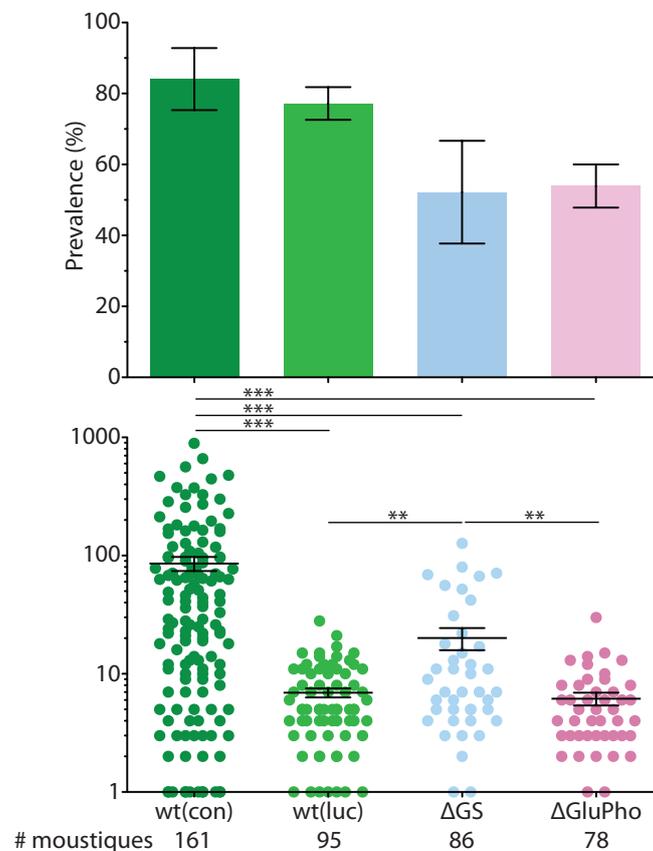


Figure 47 : Prévalence et niveau d'infection des parasites Δ GS et Δ GluPho comparés aux parasites wt(con), wt(luc) 2 days post passage.

3 expériences indépendantes.

Détermination de l'IC₅₀ sur les mutants in vitro

Les parasites invalidés pour la GS, la γ GCS, la GR ou la GluPho ont été exposés à différents antipaludiques *in vitro*. Leur sensibilité à ces antipaludiques a été comparées à celle des parasites wt(con) et wt(luc). Les mutants n'ayant pas été réalisés dans le même background, la détection se fait de deux façons différentes. La viabilité des parasites Δ GS et Δ GluPho est mesurée par luminescence et le contrôle utilisé est wt(luc). Les parasites Δ GR et Δ γ GCS (ne comprenant pas de luciférase) sont détectés par cytométrie par incorporation du colorant Hoechst à l'ADN des parasites à tous les stades. Au stade schizonte, le signal Hoechst est plus fort qu'à n'importe quel autre stade, cela permet de quantifier les parasites ayant continué lors développement pendant les 24h d'incubation. Le contrôle utilisé est wt(con).

Ces deux méthodes de détection donnent des IC₅₀ différentes pour certains antipaludiques (bMD1c (IC₅₀ 5x et 10x supérieure avec une détection au Hoechst) et similaires pour d'autres (CQ et DHA) (figure 48). Ses différences pourraient être due au fait que l'on mesure deux variables distinctes dans les deux cas. La détection à la luciférase est basée sur l'activité de l'enzyme et augmente dans les parasites vivants, mesure de la quantité de substrat transformé alors que la détection au Hoechst mesure la quantité de parasites s'étant développés en schizontes ou restés aux stades juvéniles. Or, le Hoechst est incorporé à l'ADN quel que soit l'état des schizontes (vivants ou non). Il est possible que les IC₅₀ mesurées avec le Hoechst soient plus hautes du faite de la détection de faux positifs.

Nous avons employé plusieurs antipaludiques contrôles :

(i) La chloroquine (figure 48, CQ) interrompt la cristallisation de l'hème, ce qui n'est pas directement lié au métabolisme du GSH. Les mutations ne devraient donc pas affecter la sensibilité du parasite. C'est effectivement ce que nous avons observé, avec des IC₅₀ similaires entre les mutants et contrôles, sauf pour le mutant Δ GluPho plus sensible. Cependant, de grands écarts-types ont été calculés pour les 6 parasites.

(ii) La dihydroartémisinine (figure 48, DHA) est très utilisée avec un autre antipaludique dans les traitements combinés à artémisinine (ACTs) administrés aux patients même si son mode d'action est encore méconnu. On observe une augmentation de la sensibilité des mutants (Δ GS, Δ GluPho, Δ GR et Δ γ GCS) à la DHA. Ce résultat est cohérent avec le fait que ces mutants seraient a priori plus sensibles au stress oxydatif que les souches sauvages, l'invalidation des enzymes GR, GS, γ GCS ou GluPho entraînant une augmentation du stress oxydatif chez le parasite.

(iii) Le bleu de méthylène (figure 48, MB) est un redox cycler capable de réduire la methHb(Fe^{3+}) en oxyHb(Fe^{2+}) via sa forme oxydée leuco-bleu de méthylène et donc d'empêcher la cristallisation de l'hème de façon indirecte. C'est également un inhibiteur non compétitif de la *PfGR*, déplaçant le parasite de son GSH (Schirmer et al., 2003). Nous attendions une synergie et les résultats sont indifférents (γ GCS) et antagoniste (GS). Une autre équipe a publié que le mutant *P. berghei* invalidé pour la γ GCS est indifférent au bleu de méthylène (Pastrana-Mena et al., 2010). Il est très probable que le GSH soit importé de l'érythrocyte hôte par le parasite *P. berghei*, rétablissant l'homéostasie redox.

L'invalidation de la GR, soustrait une des cibles supposées du bleu de méthylène et diminue la régénération du GSH à partir du GSSG dans le parasite. Or le Δ GR semble indifférent au bleu de méthylène. Ce résultat est confirmé dans la littérature (Pastrana-Mena et al., 2010). Le bleu de méthylène reste actif sur les parasites *P. berghei* Δ GR, probablement par bioactivation par d'autres flavoenzymes NADPH-dépendantes.

L'invalidation de la GluPho réduit la régénération de NADPH, cofacteur essentiel de la GR. Le mutant Δ GluPho est moins sensible au bleu de méthylène (IC_{50} x2 par rapport à la souche sauvage). Il est important de rappeler que la Δ GluPho est viable chez *P. berghei* mais pas chez *P. falciparum* (Allen et al., 2015).

(iv) Le bMD1c (figure 48, bMD1c) a été proposé de rentrer dans un cycle redox avec les deux GR (du parasite et de l'érythrocyte infecté) et consommer les stocks de NADPH, diminuer la méthémoglobine et induire la précipitation des hémichromes dans la membrane de l'érythrocyte infecté. Contrairement au

modèle proposé, le bMD1c n'a pas d'effet différent sur les Δ GS et Δ γ GCS comparé à leur souche sauvage respective. L'absence de différence entre Δ GR et wt(con) suggère que la GR de *P. berghei* n'est pas la cible principale du bMD1c. Une faible synergie est mesurée pour le mutant Δ GluPho alors que l'inhibition de la régénération du NADPH, présageait un antagonisme, comme cela a été mesuré pour le bleu de méthylène. L'invalidation de la GluPho est viable chez *P. berghei* et pas chez *P. falciparum*, suggérant qu'une autre source de NADPH est produite soit via la cellule hôte ou dans le parasite *P. berghei*. Ainsi, que le parasite soit exposé au bMD1c ou non, l'apport en NADPH ou de ses précurseurs synthétiques serait assuré par cet influx.

La sensibilité des quatre mutants est dans la même échelle de valeur que celle de leur contrôle respectif. Notons cependant que le mutant Δ GluPho est légèrement moins sensible que le contrôle wt(luc), alors que le modèle prédit l'inverse. Le mode d'action du bMD1c est donc vraisemblablement différent de celui proposé ou laisse présager des voies de régulation alternatives pour contourner la perturbation de l'équilibre redox. En particulier, l'absence de différence entre les mutants Δ GR, Δ GS et Δ γ GCS et leur contrôle respectif suggère que la GR parasitaire n'est pas la cible principale du bMD1c. Cela dit, même si c'est une autre flavoenzyme qui est la cible du bMD1c, le mécanisme d'action du bMD1c sur le globule rouge infecté n'est pas nécessairement modifié, i.e la GR peut être remplacée par cette autre flavoenzyme, entraînant les mêmes réactions. Dans le modèle, la bioactivation du bMD1c a lieu dans le globule rouge, potentiellement grâce à la GR de l'hôte, qui elle, n'est pas invalidée.

Cependant, l'absence d'augmentation de l'IC₅₀ dans les parasites invalidés pour la GluPho est contradictoire avec le modèle. En effet, la GluPho est l'enzyme principale de recyclage du NADP en NADPH dans le parasite, et la plupart des flavoenzymes utilisent le NADPH comme source d'électron. Nos données suggèrent que le parasite est capable d'importer du NADPH réduit à partir de sa cellule hôte, et/ou que la flavoenzyme cible utilise un autre donneur d'électron que le NADPH (Jortzik & Becker, 2012b; Patzewitz et al., 2012).

IC ₅₀ ± SD (nM)						
Agent	Luciférase			Hoechst		
	Wt(luc)	ΔGS	ΔGluPho	Wt(con)	ΔγGCS	ΔGR
CQ	245 ± 177	350,5 ± 304	84,5 ± 14	250 ± 97	467,8 ± 450	221 ± 30
Ato	1,3 ± 0,4	Not active	Not active	5,6 ± 7	31,4 ± 44	Not active
DHA	22,5 ± 0,6	7,4 ± 3,8	10,9 ± 14	36,5 ± 7,7	16,2 ± 9,2	24,8 ± 15
MB	17,8 ± 4,3	60,1 ± 1	42,3 ± 8	43,4 ± 4	39,1 ± 11	24,2 ± 11
bMD1c	26,3 ± 1,9	16,8 ± 10	17,4 ± 1	204,8 ± 7,5	229,8 ± 83	221,7 ± 12

Figure 48 : IC₅₀ (nM) et écart type (SD) mesurées pour les parasites invalidés et leurs contrôles respectifs. La survie des parasites a été mesurée avec un test luciférase pour les parasites exprimant cette enzyme, ou par FACS en utilisant un intercalant de l'ADN (Hoechst). Les cases colorées en vert indiquent une synergie alors que celles colorées en rouge un antagonisme.

CQ : chloroquine ; Ato : atovaquone ; DHA : dihydroartémisinine ; MB : bleu de méthylène ; bMD1c : benzylménadione 1c.

Chaque IC₅₀ comprend au moins 2 expériences indépendantes.

(v) L'atovaquone a été choisi initialement comme antipaludique contrôle. Son mode d'action ciblant le cyt bc1 de la chaîne respiratoire mitochondriale indiquait l'absence de lien avec le métabolisme du GSH. Nous n'attendions donc aucun changement d'IC₅₀ des mutants par rapport à la souche sauvage. Or nous avons observé une résistance claire des mutants ΔGS, ΔGR et ΔGluPho à l'atovaquone (figure 48 et figure 49 A et B). De plus, il a été surprenant de constater que si ΔGS est résistant, ΔγGCS se comporte comme le contrôle (figure 49 A et B). Or ΔγGCS est l'enzyme précurseur du ΔGS.

La région où se situe le gène d'intérêt **cyt b** chez les parasites ΔGS et ΔGluPho ont été séquencés. Ni les ΔGS, ni les ΔGluPho ne montrent de variation de leur gène *cytb* par rapport au wt(luc). Les parasites ΔGR et ΔγGCS sont en court de séquençage et seront comparés au wt(con).

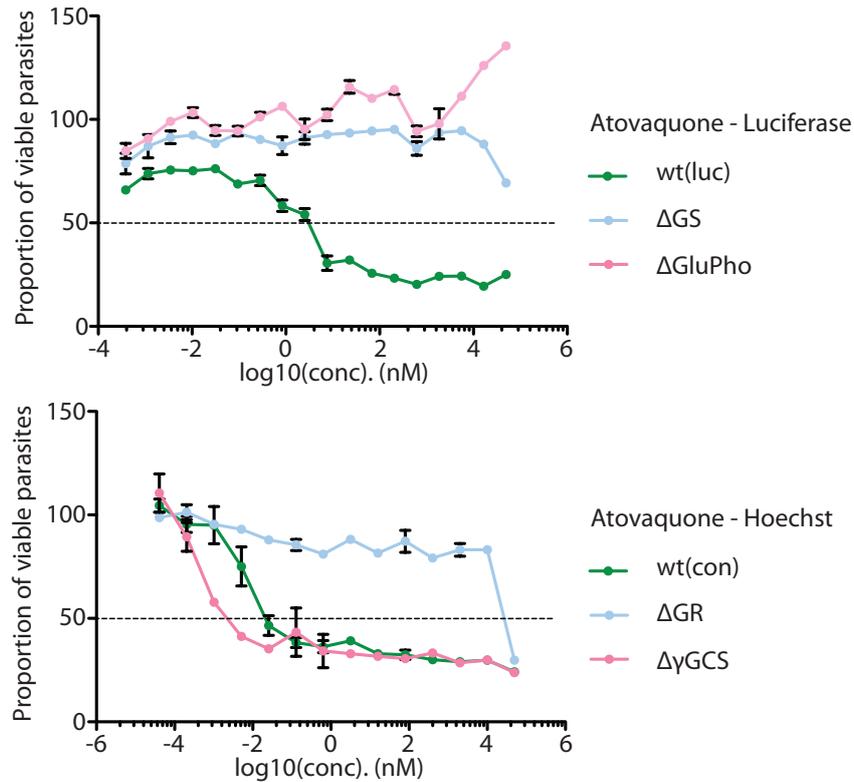


Figure 49 : Courbes représentatives des IC₅₀ mesurées pour l'atovaquone. La détection a été faite (A) à la luciférase pour les mutants ΔGS et ΔGluPho avec leur contrôle respectif wt(luc) (IC₅₀ de 1.6nM) ou (B) au Hoechst pour les mutants ΔGR et ΔγGCS avec leur contrôle respectifs wt(con) (IC₅₀ de 0.8nM). Chaque point est un triplicata d'une concentration donnée.

Drug assay sur les mutants in vivo

La parasitémie des souris wt(con) traitées au tween80 (tw) augmente jusqu'à atteindre un plateau à 15% 4 jours post passage (figure 50 A, jour 3). La parasitémie des souris ΔGS traitées au tween80 (tw) oscille entre 3 et 6 % pendant toute la durée de l'expérience (figure 50 B). Celle des souris ΔGluPho traitées au véhicule (tw) augmente jusqu'à 4% puis varie fortement (figure 50 C). La parasitémie des souris wt(con) traitées au bleu de méthylène ne dépasse pas 1%, mais 2 jours après la dernière injection (jour 5), le nombre de parasites augmente (figure 50 A, jour 5). Celle des souris wt(con) traitées au bMD1c (figure 50 A, 1c) augmente de façon similaire au contrôle tween80 jusqu'au jour 2, puis se stabilise à 5% jusqu'à la fin de l'expérience, diminuant d'un facteur 3 la parasitémie par rapport au tween80 (figure 50 A). Cette diminution de la

parasitémie par le bleu de méthylène de 95% et de 60% par le bMD1c est cohérente avec ce qui a été observé dans le chapitre précédent (figure 30, page 94).

Comme les parasitémies sont différentes d'un parasite à l'autre au jour 0 (jour du premier traitement), un ratio de la parasitémie est calculé pour les jours 1, 2 et 3 afin d'homogénéiser ces différences (pourcentage journalier divisé par la valeur mesurée le jour 0). Le ratio des souris wt(con) traitées au bleu de méthylène diminue au cours des injections, confirmant son effet antiparasitaire. Le ratio des souris wt(con) traitées au bMD1c, augmente puis diminue, jusqu'à l'équivalent du contrôle tween80 (figure 50 D, 1 jour post 3^{ième} injection)).

La parasitémie des souris Δ GS traitées au bleu de méthylène suit le même schéma que les wt(con), ne dépassant pas les 1% jusqu'au jour 5 (figure 50 B). De plus, le ratio de la parasitémie, reste très bas et n'augmente pas aux jours 1, 2 et 3 (figure 50 E).

La parasitémie des souris Δ GS traitées au bMD1c réduit dès le jour 2 et le ratio est plus faible que celui des souris traitées au tween80 au jour 2 (figures 50 B et E). Cela laisserait suggérer que le mutant Δ GS serait plus sensible que le wt(con) au bMD1c, comme cela a été montré dans les conditions *in vitro*. Au jour 3, la parasitémie des souris traitées au tween diminue jusqu'à égaler celle des souris traitées au bleu de méthylène ou au bMD1c.

La parasitémie des souris Δ GluPho traitées au bleu de méthylène diminue un jour plus tard que pour les autres mutants, mais le ratio de la parasitémie est toujours inférieur à celui du tween80, tout comme les autres mutants (figure 50 C et F).

La parasitémie des souris infectées avec le parasite Δ GluPho et traitées au bMD1c diminue à partir du jour 3, comme le contrôle wt(con). De plus le ratio de la parasitémie reste similaire à celui de la souris traitée au tween80 les jours 1, 2 et 3 (figure 50 C et F). Cela laisserait suggérer que le mutant Δ GluPho serait autant sensible que le wt(con) au bMD1c.

Le suivi des parasitémies des souris traitées *in vivo* permet de constater que le bleu de méthylène conserve son action sur les deux mutants Δ GS et Δ GluPho (ratio de parasitémie toujours inférieur à celui du tween, tous les jours). Cela est cohérent avec la littérature, n'ayant pas détecté de différence d'efficacité *in vitro* ni *in vivo* du bleu de méthylène sur des mutants invalidés pour la GR ou la γ GCS (Pastrana-Mena et al., 2010).

L'action du bMD1c est différente entre les deux mutants : (i) Δ GS semble légèrement plus sensible au bMD1c que le wt(con), résultat cohérent avec ce qui est attendu et (ii) Δ GluPho est aussi sensible que wt(con). Ce résultat ne correspond pas à ce que nous attendions, c'est-à-dire que Δ GluPho soit plus sensible.

Ces résultats remettent en question l'hypothèse selon laquelle le bMD1c cible exclusivement la GR du parasite. Afin de vérifier plus spécifiquement si le mode d'action supposé est erroné, nous avons affiné ces résultats par la mesure d'IC₅₀ *in vitro* sur des parasites invalidés pour des enzymes clés du modèle pour déterminer s'il y avait une différence entre les mutants et le parasite sauvage.

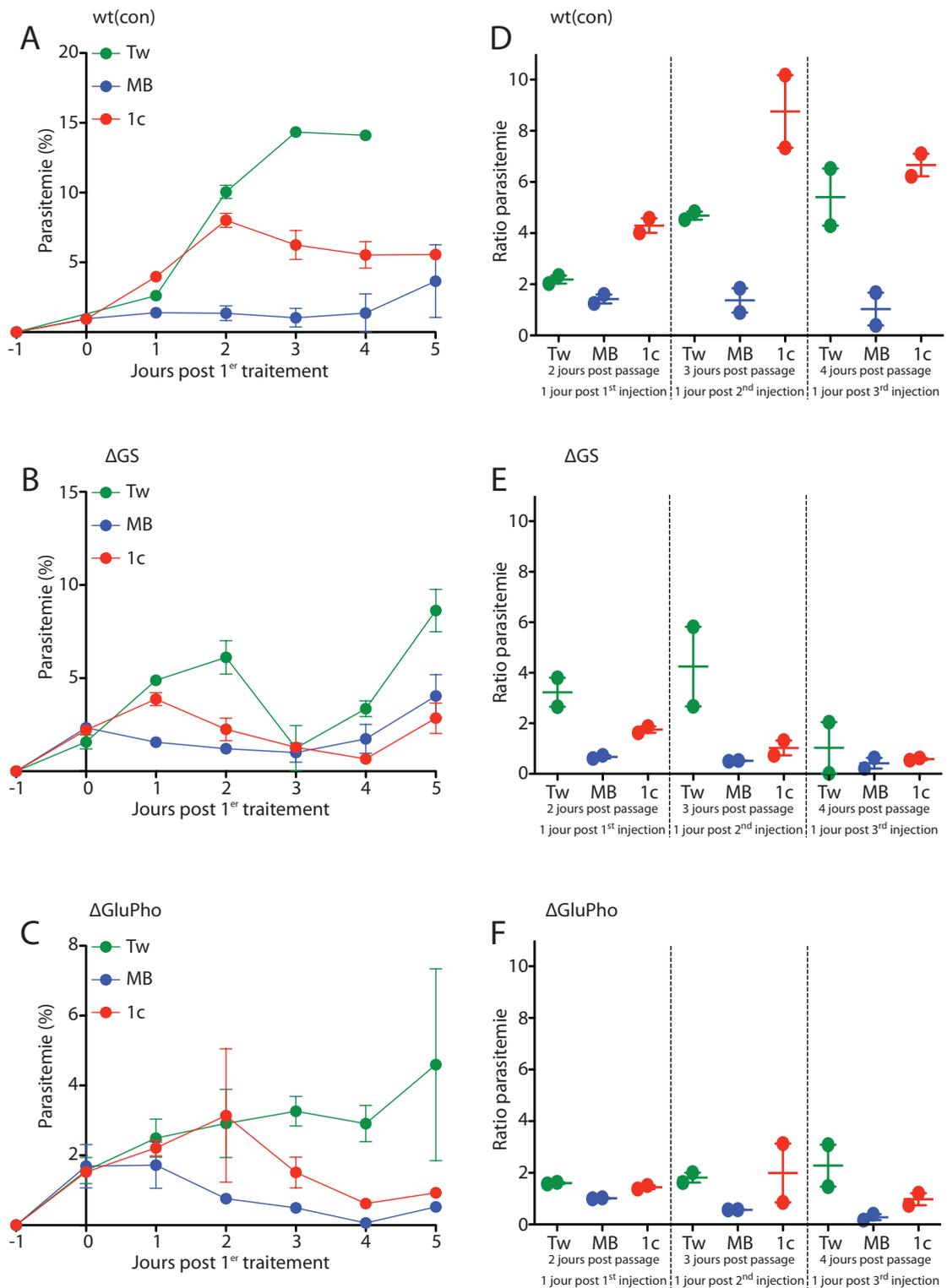


Figure 50 : Évolution de la parasitémie *in vivo* au cours du temps pour les parasites sauvages PbGFPcon (wt (con)) et les parasites mutés Δ GS et Δ GluPho avec traitement au bleu de méthylène (MB) ou au bMD1c (1c).

48 A à C : Les parasitémies sont représentées au cours du temps, pour wt(con), Δ GS et Δ GluPho après comptage des frottis sanguins réalisé quotidiennement et avant chacun des trois traitements. 48 D à F : Un ratio de ces mêmes parasitémies (parasitémie du jour divisée par la parasitémie du jour 0 avant traitement) est calculé pour les jours 1, 2 et 3 afin d'homogénéiser les parasitémies et de mieux quantifier l'effet des traitements.

Les souris sont injectées par voie i.p. au bMD1c (30mg/kg) ou de bleu de méthylène (15mg/kg) pendant trois jours consécutifs. Le Tween80 est le véhicule utilisé pour ces composés (70% tween80, 30% EtOH, 1/10 in H₂O).

Expériences indépendantes comprenant 2 souris par condition.

Discussion et perspectives du chapitre 3

La génération des mutants Δ GS et Δ GluPho avait pour but de tester le modèle d'action du bMD1c en testant leur sensibilité vis-à-vis du composé.

L'antagonisme de la fosmidomycine (ciblant la DOXR) et de bMD1c nous a conduit à essayer d'invalider la DOXR. Or cette invalidation est non viable chez *P. falciparum* (Garg et al., 2015) et chez *P. berghei*, mettant en évidence le rôle essentiel de cette enzyme aux stades érythrocytaires.

Les mutants invalidés pour la GS ou la GluPho sont viables chez *P. berghei* mais pas chez *P. falciparum* pour les stades asexués (Allen et al., 2015; Jortzik et al., 2011; Jortzik & Becker, 2012a). Leur développement est plus lent aux stades érythrocytaires dans la souris et ne dépasse pas le stade oocyste chez le moustique. La génération des mutants Δ GS et Δ GluPho avait pour but de tester le modèle d'action du bMD1c en testant leur sensibilité vis-à-vis du composé. Pour ce faire, des IC_{50} ont été déterminées *in vitro* avec les quatre mutants Δ GS, $\Delta\gamma$ GCS, Δ GR et Δ GluPho avec bMD1c. La sensibilité des quatre mutants au bMD1c n'est pas drastiquement différente de celle de leur contrôle respectif en condition *in vitro*, suggérant que le modèle proposé pour le mode d'action du bMD1c est à revoir en partie.

Cela met en évidence que le modèle supposé du bMD1c ciblant la GR du parasite uniquement est plus complexe que celui suggéré.

Le bMD1c agit dans le parasite sur une autre cible primaire, qui ne peut être identifiée ici avec ces quatre mutants. D'autres parasites invalidés ou alors surexprimant un gène codant pour une autre flavoenzyme que la GR doivent être utilisés. En effet, la surexpression d'une enzyme clé du mécanisme d'action contrebalancerait l'action du bMD1c et rendrait le parasite mutant moins

sensible, voire résistant. Des nouveaux mutants pourraient alors être générés car les plasmides spécifiques existent et sont accessibles (institut Sanger). De nouvelles pistes de cibles directes ou indirectes pour bMD1c sont l'aconitase, la superoxyde dismutase (SOD), la thiorédoxine réductase, la dihydroorotate déshydrogénase et la lipoamide déshydrogénase. La sélection de ces enzymes s'est faite sur la base de résultats préliminaires obtenus dans le cadre de la collaboration entre E. Davioud-Charvet et B. Meunier. Des levures génétiquement modifiées pour des enzymes du système redox ont été exposées au bMD1c. Celles présentant une sensibilité différente de celle de la souche sauvage étaient modifiées pour les enzymes citées précédemment. Aujourd'hui, les mutants invalidés ou surexprimant une de ces enzymes du système redox sont peu nombreux (figure 51).

Flavoenzymes	Rôle	Mutant disponible chez <i>P. berghei</i>
Aconitase	Appartient au cycle de Krebs, isomérisé le citrate en isocitrate	Non
Superoxyde dismutase (SOD)	Catalyse la dismutation du O_2^- en O_2 + H_2O_2	Non
Thioredoxine réductase (TrxR)	Impliquée dans la lutte contre le stress oxydatif	Oui : mutant invalidé pour la TrxR (RMgm-586)
Dihydroorotate déshydrogénase (DHODH)	Protéine mitochondriale impliquée dans la synthèse de pyrimidine	Non : gène essentiel, aucun parasite n'a pu être généré (RMgm-1277)
Lipoamide déshydrogénase	Présente dans la mitochondrie et l'apicoplaste, production de lipoamides	Non

Figure 51 : Présentation de flavoenzymes d'intérêts pouvant intervenir dans le mode d'activation/action de bMD1c. Les références des mutants disponibles sont notées lorsque celui-ci existe.

Par ailleurs, des études métabolomiques sur des globules rouges humains infectés ou non vont être réalisées prochainement. Elles permettront d'identifier les voies métaboliques modifiées par la présence de bMD1c au sein du globule rouge ou du parasite.

Des expériences de chimie « click and fish » vont également être réalisées prochainement. Ces expériences utilisent une molécule couplée avec une fonction alcyne (ou azide) capable de réagir avec un partenaire azide (ou alcyne respectivement) *in situ* dans le parasite lorsque celui-ci est incubé avec la molécule chimique (cette molécule couplée est le bMD1c dans notre cas). L'alkylation de la cible *in situ* dans le parasite se fait par irradiation des parasites traités par la molécule-outil. Après extraction des protéines totales, la mise en évidence des protéines alkylées par l'agent chimique est réalisée en gel d'électrophorèse SDS-PAGE par la réaction « click » après ajout du partenaire fluorescent de la réaction : soit un fluorophore-azide (soit un fluorophore alcyne). Après migration sur le gel, les protéines adduites sont colorées et comparées aux protéines extraites de parasites non irradiés.

Ce processus donnera certainement de nouvelles pistes pour mettre en évidence une nouvelle cible du bMD1c. Une invalidation ou une surexpression des gènes d'enzymes clés dans ces nouvelles voies pourront alors être réalisées chez *P. berghei* et évaluer *in vivo* la pertinence du nouveau modèle.

Enfin les résultats très surprenants concernant la résistance complète des mutants Δ GR, Δ GS et Δ GluPho à l'atovaquone seront analysés. L'atovaquone a été choisie pour son action sur le cytochrome bc1 mitochondrial du parasite, mécanisme a priori très éloigné du métabolisme du GSH (Siregar et al., 2015; Siregar, Syafruddin, Matsuoka, Kita, & Marzuki, 2008; Song et al., 2015). Or les trois mutants sont résistants à l'atovaquone. Ce phénomène de résistance très reproductible n'est pas dû chez Δ GS et Δ GluPho à une mutation quelconque du cytochrome bc1. Ce gène a été séquencé chez wt(luc), Δ GS et Δ GluPho et les trois séquençages ne montrent aucune différence. Le séquençage de wt(con), Δ GR et Δ γ GCS sont en cours. Il serait intéressant de tester si ce phénomène de résistance

à l'atovaquone est conservé chez *P. falciparum* avec les combinaisons d'inhibiteurs spécifiques de la GR, de la GS ou de la GluPho.

L'apparition de cette résistance surprenante pourrait mettre en lumière un nouveau mécanisme de résistance à l'atovaquone.

DISCUSSION GENERALE

Discussion générale

L'objectif de ce doctorat était de vérifier si le composé bMD1c possède une activité double, éliminant à la fois les stades sanguins asexués responsables des symptômes cliniques et les stades sexués, responsable de la transmission au moustique. Pour répondre à ces questions, j'ai dû dans un premier temps développer un protocole robuste pour tester l'effet des molécules antipaludiques sur la transmission du parasite des souris aux moustiques (Chapitre 1). Puis j'ai mesuré l'activité de blocage de transmission de bMD1c, de deux de ces dérivés (Chapitre 2) et de la molécule 1o (Chapitre 1). Par ailleurs, nous nous sommes interrogés sur l'effet du stress oxydatif supplémentaire chez les moustiques après exposition à un des deux *redox cyclers* bMD1c ou bleu de méthylène. Nous avons mesuré l'effet sur la fitness des moustiques et le développement du parasite à cet instant (Chapitre 1). Enfin, j'ai voulu démontrer le mode d'action du bMD1c dans le parasite *in vivo* (Chapitre 3).

Pour mesurer la capacité d'un composé à bloquer la transmission, plusieurs types d'essais existent :

- Beaucoup sont centrés sur les gamétocytes de *P. falciparum*. Ces tests sont réalisés *in vitro*.
- L'exflagellation ou la production de mâles gamètes motiles permet de déterminer si le parasite est fonctionnel ou non pour la fécondation.
- Les essais sur les oocinètes de *P. berghei* sont robustes et permettent de mesurer facilement l'action d'un composé (beaucoup plus délicat avec *P. falciparum* ou *P. vivax*).
- L'énumération des oocystes reste la méthode standard pour évaluer la transmission du parasite au moustique. L'ingestion des parasites peut se faire sur l'hôte directement (direct feeding assay; DFA) ou par l'intermédiaire d'un repas sanguin sur membrane sur sang complet (direct membrane feeding assay ; DMFA) ou encore par l'intermédiaire d'un repas sanguin sur membrane sur une culture de gamétocytes

(standard membrane feeding assay ; SMFA).

- Enfin les derniers stades sexués les sporozoïtes, peuvent être obtenus par extension d'un essai sur les oocystes. La limite de ces essais est que le seuil de détection des sporozoïtes est très bas, rendant l'essai peu fiable pour l'instant (Sinden et al., 2012).

Mais aucun des ces essais n'est standard pour caractériser l'effet sur la transmission. Si la SMFA est considérée comme étant une méthode de prédilection, c'est un test où les parasites sont exposés à l'antipaludique *in vitro* et ne tient pas compte du métabolisme de l'hôte qui pourrait interférer avec l'efficacité du composé. Nous avons décidé d'adapter ces protocoles existants pour pouvoir reproduire des conditions plus proches de la situation sur le terrain. Nous avons abouti à un protocole robuste, permettant de tester l'action de nos composés *in vivo* et sur la transmission.

Les problèmes de reproductibilité de nos essais et les contradictions entre nos résultats et ceux de nos collaborateurs à Bâle pour un même composé, nous ont fait réfléchir sur notre protocole. La procédure à laquelle nous avons aboutie réduit les différences entre souris (génétique ou parasitaire), est très reproductible et permet de mesurer facilement plusieurs paramètres *in vivo* sur une même expérience (effet sur la parasitémie, les oocynètes, les oocystes).

Basés sur cette procédure, nous avons testé l'effet *in vivo* de plusieurs composés antipaludiques sur la transmission du parasite au moustique. Les composés bMD1c, bMD40 (chapitre2) et 1o (chapitre1) bloquent la transmission du parasite au moustique de façon partielle (bMDs) ou complète (1o). Ces composés possèdent une double activité (sur les stades asexués et sexués) ce qui est fortement valorisée par MMV.

Le composé 1o est plus biodisponible que bMD1c *in vivo*. Les souris sont guéries par administration per os (essais réalisés au SwissTPH à Bâle, publication soumise) ou après 3 injections i.p de 1o. Ces injections *in vivo* bloquent complètement la transmission du parasite au moustique. Ce composé très prometteur est également actif *in vitro* contre les gamétocytes de *P. falciparum*.

Cependant, au-delà d'une certaine concentration, un effet gamétostatique a été observé pour les gamétocytes de stades intermédiaires (8 jours) et matures (11 jours) : ils stoppent leur développement mais ne sont pas éliminés. Une expérience intéressante aurait été de tester si les gamétocytes reprennent leur développement si le composé est retiré.

Si cette molécule s'est montrée très prometteuse, sa structure est très différente de celle des bMDs. L'ensemble stéroïde couplé au composé actif forme à eux seuls un très gros complexe chimique qu'il sera compliqué de modifier par ajout de dérivés supplémentaires par exemple.

Par ailleurs, la molécule 10 a été synthétisée par nos collaborateurs à Giessen, il ne nous appartient pas de définir le futur de cette molécule. Sur un point de vue personnel, et considérant l'efficacité de cette molécule, il serait dommage de ne pas aller plus loin et de pousser la molécule 10 au stade de médicament. Une des étapes suivantes seraient de valider un effet du composé sur des formes hépatiques du parasite.

Le bMD1c est un composé à l'action rapide, agissant sur les stades anneaux à faible IC_{50} (≈ 50 nM) contre *P. falciparum in vitro*. Si bMD1c conserve son efficacité contre *P. berghei in vitro* ($IC_{50} \approx 25$ nM), il est moins efficace *in vivo*. Cette perte d'activité serait liée à sa faible biodisponibilité et solubilité mais non pas à sa tendance à lier les protéines sériques. En effet bMD40, un dérivé 10x plus soluble et protégé des attaques nucléophiles est plus efficace *in vivo* que bMD1c, alors que bMD30, dérivé ayant peu d'affinité pour les protéines sériques, est autant voire moins efficace de bMD1c *in vivo*.

Nous avons montré que bMD1c et bMD40 réduisent la parasitémie de 50% et 90% respectivement 2 jours après la dernière des trois injections. Les deux composés permettent de réduire significativement la transmission des parasites aux moustiques *in vivo* (prévalence et charge parasitaire). Nous avons montré que cet effet n'est pas dû à un effet sur les réticulocytes, mais bien à un effet direct sur les parasites. En effet chez *P. berghei*, bMD1c et bMD40 réduisent le nombre de gamétocytes mâles *in vivo* ainsi que leur fonctionnalité, mais aussi le nombre d'oocynètes *in vitro* et *in vivo*.

Si le composé bMD1c n'est actif que sur les jeunes gamétocytes *P. falciparum*, bMD40 est actif contre tous les stades gamétocytes *P. falciparum* (II-III, IV et V).

Le composé bMD1c est une bonne molécule tête de série mais bMD40 est plus efficace et est très prometteur. Même s'il nécessite également des améliorations, bMD40 est une étape de plus vers la sélection d'un candidat médicament provenant de la famille des bMDs. En effet, la structure des bMDs est facilement modifiable chimiquement et la molécule peut encore être améliorée.

D'autres molécules candidates médicament sont plus efficaces que bMD1c, telles que le DDD107498 (quinoline-4-carboxamide), le OZ439 (ozonides) ou le NITD609 (spiroindolones). Les trois possèdent une activité *in vitro* exceptionnelle sur les souches de parasites de laboratoires ou d'isolats, sur les stades asexués ou gamétocytes matures (Birkholtz et al., 2016; Fu, 2016; Mäser et al., 2012). Les limites des bMDs comparés à ces antipaludiques, sont très probablement leur faible solubilité. Les trois composés cités plus haut ainsi que 1o peuvent être administrés et sont curatifs par voie orale (1o) et unique (OZ439 et NITD609) et possèdent une demi-vie longue. La solubilité des bMDs doit être améliorée pour assurer une meilleure biodisponibilité.

Cependant les bMDs possèdent le sérieux avantage de ne pas engendrer facilement de résistance. En effet, sous pression médicamenteuse du DDD107498 des parasites *P. falciparum* (3D7, 7G8 et Dd2) ont développé une résistance à la molécule (Fu, 2016). Des conditions similaires ont été appliquées avec le bMD1c et aucun parasite résistant n'a été généré (Ehrhardt et al., 2016).

Une expérience intéressante à mener avec les bMDs, serait de tester l'infectiosité des moustiques nourris sur les souris traitées aux bMD1c ou bMD40. Un groupe de moustiques pourrait être conservés après chaque étape des repas sanguins quotidien des tests de blocage de transmission. Vingt et un jours après ce premier repas sanguin infectieux, une souris naïve leur serait proposée pour tester s'ils les parasites sont capables d'infecter ce nouvel hôte vertébré.

Une autre information importante serait de mesurer l'effet des bMDs sur les stades hépatiques. Des souris naïves seraient traitées à différents moments avant ou après un repas sanguin de moustiques infectieux et l'apparition de parasites sanguins serait surveillée. Un problème technique qu'il faudrait résoudre est que

l'anesthésique que nous utilisons pour les souris diminue l'efficacité des bMDs, or les souris doivent être anesthésiées pour les repas sanguins.

Au final, bMD1c couvrent plusieurs des critères de sélections de MMV pour les bons candidats médicaments. De plus si cette molécule montre quelques handicaps, ceux-ci ne sont pas irréversibles et peuvent être améliorés (notamment la solubilité) :

- (xi) Avoir une efficacité et une vitesse d'action aussi importante que l'artémisinine et ciblant les jeunes stades anneaux : ✓
- (xii) Avoir une bonne biodisponibilité orale : ✗ **Pas irréversible, est en court d'amélioration**
- (xiii) Réduire, voire stopper la transmission d'un patient à l'autre : ✓
- (xiv) Être actifs sur les 5 espèces de parasites humains sans résistance croisée: (✓) testé sur *P. falciparum* et *P. vivax*. Actif sur les souches *Pf* résistantes à pyriméthamine, à la quinine et/ou à la méfloquine, à la monodeséthylamodiaquine ou à la chloroquine.
- (xv) Avoir un faible risque de sélectionner des parasites résistants : ✓
- (xvi) L'élimination complète des hypnozoïtes hépatiques : **N.D.**
- (xvii) Être un traitement prophylactique empêchant une nouvelle infection de s'établir : **N.D.**
- (xviii) Être un traitement prophylactique pour des personnes vulnérables (jeunes enfants et femmes enceintes) : **N.D.**
- (xix) Être sans danger pour les personnes vulnérables (jeunes enfants, femmes enceintes, personnes déficientes pour la G6PDH, infectées par le VIH ou la tuberculose, mal nourrit, ...) : (✓) pour G6PDH^{-/-} ; **N.D.** pour les autres
- (xx) Être aussi peu cher que la Chloroquine, idéalement un traitement devrait coûter 1\$: ✓

Si l'on considère les critères testés jusqu'à aujourd'hui, les bMDs sont de bons candidats médicaments qui répondent aux attentes d'organisations telles que

MMV (Burrows, Hooft van Huijsduijnen, Möhrle, Oeuvray, & Wells, 2013; Delves et al., 2012).

En parallèle des effets sur l'hôte vertébré, nous voulions savoir si les *redox cyclers* bMD1c et bleu de méthylène auraient des effets sur le vecteur du parasite, les moustiques *A. gambiae*. Or, introduit dans les moustiques, ces *redox cyclers* n'ont montré aucun effet ni sur la survie ni sur l'infection. Malgré le stress oxydatif enduré lors d'un repas sanguin infectieux, les deux composés perdent toute efficacité contre les parasites dans les moustiques. La faible biodisponibilité du bMD1c aurait pu être une explication, mais même avec une grande efficacité et solubilité, le bleu de méthylène est tout aussi inefficace. Des études du métabolisme redox des moustiques pourraient définir des enzymes redox spécifiques aux moustiques utilisées comme cibles pour des insecticides.

Il est important pour la promotion d'un candidat médicament de connaître son mode d'action. En ce qui concerne le bMD1c, son mode d'action ne ciblerait pas uniquement la GR parasitaire, comme cela a été supposé en vue des résultats biochimiques obtenus *in vitro*. En effet, l'absence de différence d'efficacité entre les mutants invalidés pour les enzymes impliqués dans le métabolisme du GSH, montre que la GR parasitaire n'est sans doute pas la seule cible du bMD1c mais une autre flavoenzyme NADPH-dépendante.

Le mutant Δ GluPho utilisé dans le chapitre 3 montre peu d'effet vis-à-vis du bMD1c (une faible synergie). Il est probable que l'invalidation de l'enzyme soit contrebalancée par le parasite *P. berghei* par sa capacité à importer du NADPH. Cela expliquerait la létalité de cette invalidation chez *P. falciparum*.

La différence fondamentale entre l'action d'un *redox cycler* et une invalidation (chimique avec un inhibiteur ou génétique) est que le redox cycler possède deux actions : (i) consommation de façon continue du stock de NADPH du parasite et (ii) inhibition d'une flavoenzyme, alors que lors d'une invalidation seule l'enzyme est retirée. Chez *P. berghei*, l'import de GSH rend possible l'invalidation de la GR mais peut également contrebalancer un des effets du bMD1c.

En dehors des expériences de « click and fish » en cours pour définir de nouvelles pistes pour le mode d'action des bMDs (expériences décrites à la fin du chapitre 3), la bioinformatique pourrait également être une aide précieuse. En effet, des plateformes permettent aujourd'hui de réaliser des criblages virtuels et d'identifier toutes les cibles protéiques possibles d'une molécule (Bionext, France). Ce type d'approche donne une large gamme de touches qui après analyse, donnerait de nouvelles pistes de protéines ciblées par les bMDs. Par ailleurs, la collaboration avec Brigitte Meunier a déjà permis d'identifier plusieurs flavoenzymes intéressantes par le criblage de levures génétiquement modifiées. Cette approche pourrait permettre une identification rapide de plusieurs cibles possibles des bMDs.

Si le mode d'action des bMDs n'a pas encore été élucidé, cela ne freine pas son caractère prometteur d'antipaludique tête de série. En effet, plusieurs autres antipaludiques sont développés sans que le mode d'action soit connu, tel que le OZ439 ou même l'artémisinine (Charman et al., 2011).

L'observation de la résistance à l'atovaquone des parasites *P. berghei* invalidé pour la GR, la GS ou la GluPho est particulièrement intéressante et mérite d'être approfondie. Aucune mutation du gène du cytochrome bc1 n'est été observée pour les mutants Δ GS et Δ GluPho. Cette résistance des parasites invalidés pour ces enzymes du métabolisme du glutathion pourrait être un indice de l'existence d'un nouveau mécanisme de résistance à l'atovaquone, indépendant de celui déjà connu.

REMERCIEMENTS

Remerciements

Je tiens à remercier mon jury de doctorat : Dr. Brigitte Meunier, Dr. Blandine Franke-Fayard, Dr. Isabel Morlais et Dr. Alain Lescure d'avoir accepté de venir à ma thèse et de l'enrichir aux travers des discussions et des corrections qui seront les bienvenues.

Je tiens à remercier le Dr. Stéphanie Blandin pour m'avoir acceptée et encadrée pour cette étude. Pour son aide, ses conseils et son soutien, je souhaite lui exprimer ma reconnaissance.

Je remercie également ma co-directrice, le Dr Elisabeth Davioud Charvet pour son aide, ses conseils et son enthousiasme pour mon travail. Merci beaucoup Elisabeth d'être venue à mon secours lorsque j'en ai eu besoin !

Je tiens à remercier le Dr Sophie Adjalley. Sophie, plus que de m'enseigner l'art de cultiver les gamétocytes de *falciparum*, tu m'as donné envi de continuer dans le domaine de la malaria. Travailler avec toi pendant ces quelques mois fut un réel plaisir, de part les expériences que nous avons menés autant que les conversations de musique, de voyage ou de labo. Je te remercie pour tout !

Le Dr. Blandine Franke Fayard, le Prof. Chris Janse et l'équipe du Malaria Research group à Leiden. J'ai eu un accueil très chaleureux, je me suis enrichie à la fois sur les plans scientifiques et personnels et je repense avec nostalgie à mon séjour passé chez vous. Merci !

Je tiens particulièrement à remercier Christopher et Katharina pour votre soutien sans faille, vos précieux conseils scientifiques et personnels, votre humour, votre bonne humeur quotidienne et vos moments « allemands qui râlant sur les Français : Gnagnagna gnagna gna scheiBe Französen ! »

Christopher avec ton « salut ma belle ! » du matin, la journée au labo ne pouvait alors que bien se passer. Comme tu es parti plus tôt que moi, j'ai donc dû apprendre à gérer « mes problèmes de gaz » toute seule !

Katharina, merci pour ton aide dès le début de ce projet (lorsque tu étais encore dans la galère de la thèse) et à ton arrivée au labo en tant que postDoc. Les fous rires face aux boulettes des manips ou de la vie, ta précieuse aide, tes Kinder Schokolade et ton soutien !

Un grand merci du fond du cœur à tous les deux pour le temps que vous avez passé avec moi. Vous avez été mon grand frère et grande sœur scientifiques ! (Promis, je ne tenterais plus de synchroniser mes parasites avec de la saponine...)

Delphine et Marta, mes compagnes galériennes de thèse. Merci d'avoir toujours été à l'écoute de mes coups de gueule et de vidange de sac de thésarde parfois vraiment pleins ! Les repas et autre « soirée meuf » ont été bien plus salvateurs qu'ils n'y paraissent. Je rajouterai une carte essentielle à notre jeu de l'oie du labo, la carte Jean : « Jean est là, tu peux tout réparer : avance de deux cases ».

Un grand merci aux membres (actuels ou anciens) de l'équipe moustique : Nathalie, Julien, Marie, Emilie, Olivier, Mélanie, Christine, Eric, Albert, Amandine, Nicolas et Noémie.

Je remercie David et Karine pour leur aide en animalerie et les conversations en tout genre pendant les passages (en y repensant la situation est souvent drôle). La majorité de ce travail n'aurait pas pu être réalisé sans votre aide et mon aquarium ne contiendrait qu'un Ancistrus !

Je remercie mes collègues de l'IBMC pour ces lunch et afterwork beers animés, hauts en couleur et péripéties, Adrien, Miriam, Loïc, Evelyne, Alice, Nelson, Catherine et Matthieu. Je remercie également tous les membres de l'UPR9022 pour leur aide ou leurs conseils.

Mes amis de Bruxelles, Rémi, Michel et Ève, toujours là quoi qu'il arrive, quel que soit l'état dans lequel je suis ! Vous me soutenez depuis si longtemps que je ne pouvais pas ne pas vous remercier ici. Merci pour les remontages de moral et sorties bruxelloises.

Je remercie mes parents pour leur soutien inconditionnel à leur petite dernière qui a décidé de continuer de faire des études pendant si longtemps ! Merci de vous être occupé de tellement de choses pour moi.

Merci à ma sœur Aude et à Antoine pour le partage de leurs expériences et des conseils toujours appréciés. Un grand merci pour votre soutien durant cette période.

Merci Francesco pour ton soutien dans cette course de fond, ta patience face à la boule de nerf que j'étais, ta présence dans les coups durs. Merci pour tout.

Merci à ma famille à quatre pattes pour avoir absorbé tellement d'ondes négatives et de stress durant ces quatre années !

Merci à Diglee, Margaux Motin, et Curtis Wiklund, sans le savoir, vous avez rétabli un pilier essentiel de ma vie, délaissé aux profits d'autres impératifs : le dessin. J'ai retrouvé mes plumes et pinceaux grâce à vous.

ANNEXES

	Nom de marque	Espèce de <i>Plasmodium</i>	Stades affectés	Mode d'action	Commentaires
4-aminoquinolines	Chloroquine (CQ)	Toutes les espèces humaines	Stades intra-érythrocytaires. Faible action sur gamétocytes immatures	Inhibe l'hème polymérase dans la vacuole digestive (trophozoïtes) → inhibition cristallisation de l'hémozoïne	Traitement simple et efficace, bien toléré en général <i>per os</i> . Les parasites CQ ^R sont répandus en Afrique et en Asie du SE
	Amodiaquine (proche analogue de la CQ)	<i>P falcis</i> , <i>P vivax</i> , <i>P ovale</i> , <i>P malariae</i> (actif contre certaines souches PfCQ ^R)	Stades intra-érythrocytaires		Plus actif que la CQ, peu provoquer des effets secondaires neurologiques
	Ferroquine	<i>P falcis</i> , <i>P vivax</i>	Stades intra-érythrocytaires	Inhibition de la détoxification de l'hème	
8-aminoquinolines	Primaquine	<i>P falcis</i> , <i>P vivax</i> , <i>P ovale</i> , <i>P malariae</i> (inactif contre les souches CQ ^R)	Schizonts, hyponozoïtes, stades intra-érythrocytaires et gamétocytes (immatures et matures)	Mécanisme encore flou : (i) génère des ROS par interférence avec le transport d'électron dans le parasite et (ii) se lie à l'ADN pour en altérer les propriétés	Seul antipaludéen avec une action rapide et direct sur les gamétocytes (ttes espèces confondues) Effets secondaires possibles : methemoglobinemia, risque d'hémolyse chez les patients G6PD ⁻
	Tafenoquine	<i>P vivax</i>			Plus efficace que la primaquine, actif sur les hypnozoïtes
Hétérocycle aromatique	Bleue de méthylène (MB)	<i>P falcis</i> (actif contre PfCQ ^R)	Stades intra-érythrocytaires et gamétocytes (immatures et matures)	Interfère avec la polymérisation de l'hème et est un inhibiteur non compétitif de la PfGR, déplaçant le parasite de son GSH.	Premier antipaludéen synthétique. Pas d'hémolysis chez G6PD ⁻ Aucune résistance : plusieurs cibles potentielles dans le parasite

Tableaux annexes : classification et description de quelques antipaludiques (1)

	Nom de marque	Espèce de <i>Plasmodium</i>	Stades affectés	Mode d'action	Commentaires
Antifolate	Proguanil et Chlorproguanil	<i>P falcis</i>	Stades intra-érythrocytaires	Bloque la réductase dihydrofolate (DHFR) → bloque la synthèse de purine et pyrimidine)	Action lente. Utilisées en combinaison avec d'autre antipaludéen rapide (CQ) en chimio-prévention. Composé bien toléré. Peut provoquer de la résistance.
	Pyriméthamine (+sulfadoxine = Fansidar) (+sulfalene = Metakelfin) (+dapsonne = Maloprim)	<i>P falcis, P vivax, P ovale, P malariae</i> (utilisé contre <i>PfCQ^R</i> si non sévère)	Stades intra-érythrocytaires		Résistance répandue. Inefficace en Amérique du Sud et Asie du SE. Utilise en Afrique contre les cas non sévères.
Antibiotiques	Doxycycline	<i>P falcis</i>	Stades intra-érythrocytaires	Inhibe la fonction de l'apicoplaste du parasite	Action lente. Utilisation restreinte contre les infections avec parasites multirésistants en combinaison avec la quinine uniquement. Toxicité pour la peau et les dents (enfants), photosensibilité
	Fosmidomycine	<i>P falcis</i>	Stades intra-érythrocytaires	Inhibe la 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DOXP) reductoisomerase (enzyme essentielle pr la synthèse des isoprenoides	

Tableaux annexes : classification et description de quelques antipaludiques (2)

	Nom de marque	Espèce de <i>Plasmodium</i>	Stades affectés	Mode d'action	Commentaires
Chinchona alkaloides	Quinine	<i>P. falciparum</i> (actif contre <i>PfCQ^R</i> et <i>PfMQ^R</i>) <i>P. vivax</i> , <i>P. ovale</i> , <i>P. malariae</i>	Stades intra-érythrocytaires	Interfère avec la digestion de l'hémoglobine par le parasite	Utilisation contre les Pf résistant à la CQ, à la mefloquine ou autre. Relativement toxique à hautes doses.
4-quinolineméthanol	Mefloquine	<i>P. falciparum</i> (utilisé contre <i>PfCQ^R</i>), <i>P. vivax</i>	Stades intra-érythrocytaires	Formation de complexe toxique avec l'hème dans la vacuole digestive jusqu'à endommager les membranes	Utilisation thérapeutique et prophylactique réservée aux parasites multirésistants. Effets secondaires très légers.
9-phénanthrene-méthanol	Halofantrine	<i>P. falciparum</i> , <i>P. vivax</i> , <i>P. ovale</i> , <i>P. malariae</i>	Stades intra-érythrocytaires	Formation de complexes avec la ferritoporphyrine IX	Traitement pour les cas de paludisme sévères chez l'enfant et l'adulte.
Fluoro-méthanol	Lumefantrine	<i>P. falciparum</i>	Stades intra-érythrocytaires	Inhibe la formation de β -hématine	
Sulfanamides et sulfones	Sulfadoxine et Dapsone	<i>P. falciparum</i> (utilisé contre <i>PfCQ^R</i> si non sévère)	Stades intra-érythrocytaires. (Dapsone induit une augmentation de la gamétocytemie)	Compétiteur du PABA, il inhibe la formation d'acide folique.	Action lente. Bloque l'incorporation de PABA pour former de l'acide dihydrofolique. Risque d'hémolyse chez les patients G6PD déficients.
Hydroxy-naphtoquinone	Atovaquone (+proguanil = Malarone)	<i>P. falciparum</i>	Stades intra-érythrocytaires	Inhibe le cytochrome b de la chaîne respiratoire de la mitochondrie	Sans danger chez l'enfant et la femme enceinte. Efficace et mono- et bithérapie.

Tableaux annexes : classification et description de quelques antipaludiques (3)

	Nom de marque	Espèce de <i>Plasmodium</i>	Stades affectés	Mode d'action	Commentaires	
Sesquiterpene lactones	Artémisinine (= qinghaosu) (ART)	<i>P falc</i> i, <i>P vivax</i>	Stades intra-érythrocytaire et gamétoocytes (immatures et matures)	Interagit avec l'hème dans la vacuole digestive et génère des radicaux cytotoxiques AR + heme → O ₂ ⁻	Action très rapide. Grande sensibilité des parasites multirésistants. Sans danger pour les enfants et les femmes enceintes. Action gamétocydaire contre tous les stades.	
Sesquiterpene lactones	Dihydroartémisinine (=dihydroqinghaosu) (DHART)	<i>P falc</i> i, <i>P vivax</i>	Stades intra-érythrocytaires		Composé semi-synthétique. Plus efficace que l'ART.	
Ethers	Artemeter et arteether	<i>P falc</i> i, <i>P vivax</i>	Stades intra-érythrocytaires			
Sodium hydrogen succinate monoester	Sodium artesunate	<i>P falc</i> i, <i>P vivax</i>	Stades intra-érythrocytaires			Action très rapide. Utilisation chez l'enfant (voie rectale).
Trioxolane synthétique	OZ439	<i>P falc</i> i (actif contre <i>PfCQ</i> ^R , mefloquine ^R , piperazine ^R)			Nouveau trioxolane synthétique	Action rapide. Actif contre <i>PfART</i> ^R . Bloque la transmission sur membrane feeding assay.

Tableaux annexes : classification et description de quelques antipaludiques (4)

REFERENCES

- Adjalley, S. H., Johnston, G. L., Li, T., Eastman, R. T., Ekland, E. H., Eappen, A. G., ... Fidock, D. a. (2011). Quantitative assessment of *Plasmodium falciparum* sexual development reveals potent transmission-blocking activity by methylene blue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(47), E1214-23.
<http://doi.org/10.1073/pnas.1112037108>
- Alano, P. (2007). *Plasmodium falciparum* gametocytes: Still many secrets of a hidden life. *Molecular Microbiology*, *66*(2), 291–302.
<http://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05904.x>
- Allen, S. M., Lim, E. E., Jortzik, E., Preuss, J., Chua, H. H., MacRae, J. I., ... Ralph, S. A. (2015). *Plasmodium falciparum* glucose-6-phosphate dehydrogenase 6-phosphogluconolactonase is a potential drug target. *FEBS Journal*, *282*(19), 3808–3823. <http://doi.org/10.1111/febs.13380>
- Bauer, H., Kanzok, S. M., & Heiner Schirmer, R. (2002). Thioredoxin-2 but not thioredoxin-1 is a substrate of thioredoxin peroxidase-1 from *Drosophila melanogaster*. Isolation and characterization of a second thioredoxin in *D. Melanogaster* and evidence for distinct biological functions of Trx-1 and Trx-2. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(20), 17457–17463.
<http://doi.org/10.1074/jbc.M200636200>
- Bielitza, M., Belorgey, D., Ehrhardt, K., Johann, L., Lanfranchi, D. A., Gallo, V., ... Davioud-Charvet, E. (2015a). Antimalarial NADPH-Consuming Redox-Cyclers As Superior Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency Copycats. *Antioxidants & Redox Signaling*, *22*(15), 1337–1351.
<http://doi.org/10.1089/ars.2014.6047>
- Bielitza, M., Belorgey, D., Ehrhardt, K., Johann, L., Lanfranchi, D. A., Gallo, V., ... Davioud-Charvet, E. (2015b). Antimalarial NADPH-Consuming Redox-Cyclers As Superior Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency Copycats. *Antioxidants & Redox Signaling*, *22*(15), 1337–1351.
<http://doi.org/10.1089/ars.2014.6047>
- Birkholtz, L.-M., Coetzer, T. L., Mancama, D., Leroy, D., & Alano, P. (2016). Discovering New Transmission-Blocking Antimalarial Compounds: Challenges and Opportunities. *Trends in Parasitology*, *xx*, 1–13.
<http://doi.org/10.1016/j.pt.2016.04.017>

- Blandin, S. a, Wang-Sattler, R., Lamacchia, M., Gagneur, J., Lycett, G., Ning, Y., ... Steinmetz, L. M. (2009). Dissecting the genetic basis of resistance to malaria parasites in *Anopheles gambiae*. *Science (New York, N.Y.)*, 326(5949), 147–50. <http://doi.org/10.1126/science.1175241>
- Blumberg, B. J., Trop, S., Das, S., & Dimopoulos, G. (2013). Bacteria- and IMD Pathway-Independent Immune Defenses against *Plasmodium falciparum* in *Anopheles gambiae*, 8(9), 1–12. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0072130>
- Boissière, A., Tchioffo, M. T., Bachar, D., Abate, L., Marie, A., Nsango, S. E., ... Morlais, I. (2012). Midgut microbiota of the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae* and interactions with *Plasmodium falciparum* infection. *PLoS Pathogens*, 8(5), 1–12. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002742>
- Bruce, M. C., Alano, P., Duthie, S., & Carter, R. (1990). Commitment of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* to sexual and asexual development. *Parasitology*, 100 Pt 2, 191–200. <http://doi.org/10.1017/S0031182000061199>
- Buchholz, K., Schirmer, R. H., Eubel, J. K., Akoachere, M. B., Dandekar, T., Becker, K., & Gromer, S. (2008). Interactions of methylene blue with human disulfide reductases and their orthologues from *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(1), 183–91. <http://doi.org/10.1128/AAC.00773-07>
- Burrows, J. N., Hooft van Huijsduijnen, R., Möhrle, J. J., Oeuvray, C., & Wells, T. N. (2013). Designing the next generation of medicines for malaria control and eradication. *Malaria Journal*, 12(1), 187. <http://doi.org/10.1186/1475-2875-12-187>
- Butcher, G. a, & Sinden, R. E. (2003). Persistence of atovaquone in human sera following treatment: inhibition of *Plasmodium falciparum* development in vivo and in vitro. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 68(1), 111–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12556158>
- Cavalier-Smith, T. (1993). *Kingdom protozoa and its 18 phyla. Microbiological reviews* (Vol. 57).
- Charman, S. A., Arbe-barnes, S., Bathurst, I. C., Brun, R., Campbell, M., & Charman,

- W. N. (2011). Synthetic ozonide drug candidate OZ439 offers new hope for a single-dose cure of uncomplicated malaria.
<http://doi.org/10.1073/pnas.1015762108/>-
 /DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1015762108
- Coon, K. L., Vogel, K. J., Brown, M. R., & Strand, M. R. (2015). NIH Public Access, 23(11), 2727–2739. <http://doi.org/10.5061/dryad.s6223.Coon>
- Corona, M., & Robinson, G. E. (2006). Genes of the antioxidant system of the honey bee: Annotation and phylogeny. *Insect Molecular Biology*, 15(5), 687–701. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00695.x>
- Coulibaly, B., Zougrana, A., Mockenhaupt, F. P., Schirmer, R. H., Klose, C., Mansmann, U., ... Müller, O. (2009). Strong gametocytocidal effect of methylene blue-based combination therapy against falciparum malaria: a randomised controlled trial. *PloS One*, 4(5), e5318.
<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0005318>
- Delves, M. J., Ramakrishnan, C., Blagborough, A. M., Leroy, D., Wells, T. N. C., & Sinden, R. E. (2012). A high-throughput assay for the identification of malarial transmission-blocking drugs and vaccines. *International Journal for Parasitology*, 42(11), 999–1006.
<http://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.08.009>
- Delves, M. J., Ruecker, A., Straschil, U., Lelièvre, J., Marques, S., López-Barragán, M. J., ... Sinden, R. E. (2013). Male and female *P. falciparum* mature gametocytes show different responses to antimalarial drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, (April). <http://doi.org/10.1128/AAC.00325-13>
- Delves, M., Plouffe, D., Scheurer, C., Meister, S., Wittlin, S., Winzeler, E. A., ... Leroy, D. (2012). The activities of current antimalarial drugs on the life cycle stages of plasmodium: A comparative study with human and rodent parasites. *PLoS Medicine*, 9(2). <http://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001169>
- Dong, Y., Manfredini, F., & Dimopoulos, G. (2009). Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. *PLoS Pathogens*, 5(5), e1000423. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000423>
- Ehrhardt, K., Davioud-Charvet, E., Ke, H., Vaidya, A. B., Lanzer, M., & Deponte, M. (2013a). The Antimalarial activities of methylene blue and the 1,4-naphthoquinone 3-[4-(Trifluoromethyl)Benzyl]-menadione are not due to

- inhibition of the mitochondrial electron transport chain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(5), 2114–2120.
<http://doi.org/10.1128/AAC.02248-12>
- Ehrhardt, K., Davioud-Charvet, E., Ke, H., Vaidya, A. B., Lanzer, M., & Deponte, M. (2013b). The antimalarial activities of methylene blue and the 1,4-naphthoquinone 3-[4-(trifluoromethyl)benzyl]-menadione are not due to inhibition of the mitochondrial electron transport chain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(5), 2114–20.
<http://doi.org/10.1128/AAC.02248-12>
- Ehrhardt, K., Deregnacourt, C., Goetz, A.-A., Tzanova, T., Gallo, V., Arese, P., ... Davioud-Charvet, E. (2016). The redox-cycler plasmodione is a fast acting antimalarial lead compound with pronounced activity against sexual and early asexual blood-stage parasites. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, (June), AAC.02975-15. <http://doi.org/10.1128/AAC.02975-15>
- Färber, P. M., Arscott, L. D., Williams, C. H., Becker, K., & Schirmer, R. H. (1998). Recombinant Plasmodium falciparum glutathione reductase is inhibited by the antimalarial dye methylene blue. *FEBS Letters*, 422(3), 311–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9498806>
- Fu, G. (2016). HHS Public Access, 15(7556), 157–176.
<http://doi.org/10.1080/19386389.2015.1099967>.Transforming
- Ganesan, S. M., Morrisey, J. M., Ke, H., & Painter, H. J. (2012). NIH Public Access, 177(1), 29–34. <http://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2011.01.004>.Yeast
- Garg, A., Wesolowski, D., Alonso, D., Deitsch, K. W., Ben Mamoun, C., & Altman, S. (2015). Targeting protein translation, RNA splicing, and degradation by morpholino-based conjugates in Plasmodium falciparum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201515864.
<http://doi.org/10.1073/pnas.1515864112>
- Godfray, H. C. J. (2013). Mosquito ecology and control of malaria. *Journal of Animal Ecology*, 82(1), 15–25. <http://doi.org/10.1111/1365-2656.12003>
- Gonçalves, D., & Hunziker, P. (2016). Transmission-blocking strategies: the roadmap from laboratory bench to the community. *Malaria Journal*, 15(1), 95. <http://doi.org/10.1186/s12936-016-1163-3>
- Greenwood, B. M., Fidock, D. A., Kyle, D. E., Kappe, S. H. I., Alonso, P. L., Collins, F.

- H., & Duffy, P. E. (2008). Malaria: Progress, perils, and prospects for eradication. *Journal of Clinical Investigation*, 118(4), 1266–1276.
<http://doi.org/10.1172/JCI33996>
- Group, E. R. A. C. (2011). A Research Agenda for Malaria Eradication : Vaccines, 8(1). <http://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000398>
- Gupta, L., Molina-Cruz, A., Kumar, S., Rodrigues, J., Dixit, R., Zamora, R. E., & Barillas-Mury, C. (2009). The STAT pathway mediates late-phase immunity against Plasmodium in the mosquito Anopheles gambiae. *Cell Host Microbe*, 5(5), 498–507. <http://doi.org/10.1016/j.chom.2009.04.003>
- Janse, C. J., Franke-fayard, B., & Waters, A. P. (2006). Selection by flow-sorting of genetically transformed , GFP-expressing blood stages of the rodent malaria parasite , Plasmodium berghei. <http://doi.org/10.1038/nprot.2006.88>
- Janse, C. J., van der Klooster, P. F. J., van der Kaay, H. J., van der Ploeg, M., & Prosper Overdulve, J. (1986). DNA synthesis in Plasmodium berghei during asexual and sexual development. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 20(2), 173–182. [http://doi.org/10.1016/0166-6851\(86\)90029-0](http://doi.org/10.1016/0166-6851(86)90029-0)
- Jeffery, J. A., Lu, G., Pyke, A. T., Hedges, L. M., Moreira, L. A., Rocha, B. C., ... Neill, S. L. O. (2009). A Wolbachia Symbiont in Aedes aegypti Limits Infection with Dengue , Chikungunya , and Plasmodium, 1268–1278.
<http://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.042>
- Jortzik, E., & Becker, K. (2012a). Thioredoxin and glutathione systems in Plasmodium falciparum. *International Journal of Medical Microbiology*, 302(4–5), 187–194. <http://doi.org/10.1016/j.ijmm.2012.07.007>
- Jortzik, E., & Becker, K. (2012b). Thioredoxin and glutathione systems in Plasmodium falciparum. *International Journal of Medical Microbiology : IJMM*, 302(4–5), 187–94. <http://doi.org/10.1016/j.ijmm.2012.07.007>
- Jortzik, E., Mailu, B. M., Preuss, J., Fischer, M., Bode, L., Rahlfs, S., & Becker, K. (2011). Glucose 6-phosphate dehydrogenase 6-phosphogluconolactonase: a unique bifunctional enzyme from Plasmodium falciparum. *The Biochemical Journal*, 650(16), 3–5. <http://doi.org/10.1042/BJ20110170>
- Kanzok, S. M., Schirmer, R. H., Tu, I., & Iozef, R. (2000). The Thioredoxin System of the Malaria Parasite Plasmodium falciparum, 275(51), 40180–40186.
<http://doi.org/10.1074/jbc.M007633200>

- Kessl, J. J., Ha, K. H., Merritt, A. K., Lange, B. B., Hill, P., Meunier, B., ... Trumppower, B. L. (2005). Cytochrome b Mutations That Modify the Ubiquinol-binding Pocket of the Cytochrome bc 1 Complex and Confer Anti-malarial Drug Resistance in *Saccharomyces cerevisiae* *, *280*(17), 17142–17148.
<http://doi.org/10.1074/jbc.M500388200>
- Kukutla, P., Lindberg, B. G., Pei, D., Rayl, M., Yu, W., Steritz, M., ... Xu, J. (2014). Insights from the Genome Annotation of *Elizabethkingia anophelis* from the Malaria Vector *Anopheles gambiae*, *9*(5), 1–11.
<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0097715>
- Mangravita-novo, A., Vicchiarelli, M., Mcanally, D., Layton, H., Roth, G. P., Diwan, J., ... Jortzik, E. (2013). *NIH Public Access* (Vol. 55).
<http://doi.org/10.1021/jm300833h.Discovery>
- Marois, E. (2011). The multifaceted mosquito anti-Plasmodium response. *Current Opinion in Microbiology*, *14*(4), 429–35.
<http://doi.org/10.1016/j.mib.2011.07.016>
- Mäser, P., Wittlin, S., Rottmann, M., Wenzler, T., Kaiser, M., & Brun, R. (2012). Antiparasitic agents: New drugs on the horizon. *Current Opinion in Pharmacology*, *12*(5), 562–566. <http://doi.org/10.1016/j.coph.2012.05.001>
- Meissner, P. E., Mandi, G., Witte, S., Coulibaly, B., Mansmann, U., Rengelshausen, J., ... Müller, O. (2005). Safety of the methylene blue plus chloroquine combination in the treatment of uncomplicated falciparum malaria in young children of Burkina Faso [ISRCTN27290841]. *Malaria Journal*, *4*, 45.
<http://doi.org/10.1186/1475-2875-4-45>
- Müller, T., Johann, L., Jannack, B., Brückner, M., Lanfranchi, D. A., Bauer, H., ... Davioud-Charvet, E. (2011). Glutathione reductase-catalyzed cascade of redox reactions to bioactivate potent antimalarial 1,4-naphthoquinones--a new strategy to combat malarial parasites. *Journal of the American Chemical Society*, *133*(30), 11557–71. <http://doi.org/10.1021/ja201729z>
- Nixon, G. L., Moss, D. M., Shone, A. E., Laloo, D. G., Fisher, N., O'neill, P. M., ... Biagini, G. a. (2013). Antimalarial pharmacology and therapeutics of atovaquone. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *68*(5), 977–985.
<http://doi.org/10.1093/jac/dks504>
- Odom, A. R. (2011). Five questions about non-mevalonate isoprenoid

- biosynthesis. *PLoS Pathogens*, 7(12), e1002323.
<http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002323>
- Oliveira, G. de A., Lieberman, J., & Barillas-Mury, C. (2012). Epithelial nitration by a peroxidase/NOX5 system mediates mosquito antiplasmodial immunity. *Science (New York, N.Y.)*, 335(6070), 856–9.
<http://doi.org/10.1126/science.1209678>
- Painter, H. J., Morrisey, J. M., Mather, M. W., & Vaidya, A. B. (2007). Specific role of mitochondrial electron transport in blood-stage *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 446(March), 88–91. <http://doi.org/10.1038/nature05572>
- Pastrana-Mena, R., Dinglasan, R. R., Franke-Fayard, B., Vega-Rodríguez, J., Fuentes-Caraballo, M., Baerga-Ortiz, A., ... Serrano, A. E. (2010). Glutathione reductase-null malaria parasites have normal blood stage growth but arrest during development in the mosquito. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(35), 27045–56. <http://doi.org/10.1074/jbc.M110.122275>
- Patzewitz, E.-M., Wong, E. H., & Müller, S. (2012). Dissecting the role of glutathione biosynthesis in *Plasmodium falciparum*. *Molecular Microbiology*, 83(2), 304–18. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07933.x>
- Pearce, R., Kushnir, Y., Tourre, Y., Tanimoto, Y., Sifeddine, A., & Mourguiart, P. (2001). *References and Notes* 1., 291(January), 643–646.
- Preuss, J., Jortzik, E., & Becker, K. (2012). Glucose-6-phosphate metabolism in *Plasmodium falciparum*. *IUBMB Life*, 64(7), 603–11.
<http://doi.org/10.1002/iub.1047>
- RTSS Clinical Trials Partnership. (2015). Efficacy and safety of RTS, S / AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. *The Lancet*, 6736(15), 31–45. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60721-8](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60721-8)
- Ruecker, A., Mathias, D. K., Straschil, U., Churcher, T. S., Dinglasan, R. R., Leroy, D., ... Delves, M. J. (2014). A male and female gametocyte functional viability assay to identify biologically relevant malaria transmission-blocking drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(12), 7292–7304.
<http://doi.org/10.1128/AAC.03666-14>
- Schirmer, R. H., Coulibaly, B., Stich, A., Scheiwein, M., Merkle, H., Eubel, J., ...

- Kouyaté, B. (2003). Methylene blue as an antimalarial agent. *Redox Report : Communications in Free Radical Research*, 8(5), 272–275.
<http://doi.org/10.1179/135100003225002899>
- Sinden, R. E., Blagborough, A. M., Churcher, T., Ramakrishnan, C., Biswas, S., & Delves, M. J. (2012). The design and interpretation of laboratory assays measuring mosquito transmission of Plasmodium. *Trends in Parasitology*, 28(11), 457–65. <http://doi.org/10.1016/j.pt.2012.07.005>
- Siregar, J. E., Kurisu, G., Kobayashi, T., Matsuzaki, M., Sakamoto, K., Mi-ichi, F., ... Kita, K. (2015). Direct evidence for the atovaquone action on the Plasmodium cytochrome bc1 complex. *Parasitology International*, 64(3), 295–300. <http://doi.org/10.1016/j.parint.2014.09.011>
- Siregar, J. E., Syafruddin, D., Matsuoka, H., Kita, K., & Marzuki, S. (2008). Mutation underlying resistance of Plasmodium berghei to atovaquone in the quinone binding domain 2 (Qo2) of the cytochrome b gene. *Parasitology International*, 57(2), 229–232. <http://doi.org/10.1016/j.parint.2007.12.002>
- Smalley, M. E., Abdalla, S., & Brown, J. (1981). The distribution of plasmodium falciparum in the peripheral blood and bone marrow of gambian children. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 75(1), 103–105. [http://doi.org/10.1016/0035-9203\(81\)90019-5](http://doi.org/10.1016/0035-9203(81)90019-5)
- Song, Z., Clain, J., Iorga, B. I., Yi, Z., & Fisher, N. (2015). Complex Q o Site Residue 279 To Study the Trade-Off between Atovaquone Resistance and Function, 59(7), 4053–4058. <http://doi.org/10.1128/AAC.00710-15>
- Talman, A. M., Domarle, O., McKenzie, F. E., Ariey, F., & Robert, V. (2004). Gametocytogenesis: the puberty of Plasmodium falciparum. *Malaria Journal*, 3, 24. <http://doi.org/10.1186/1475-2875-3-24>
- Vitoria, M., Granich, R., Gilks, C. F., Gunneberg, C., Hosseini, M., Were, W., ... De Cock, K. M. (2009). The global fight against HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria: Current status and future perspectives. *American Journal of Clinical Pathology*, 131(6), 844–848. <http://doi.org/10.1309/AJCP5XHDB1PNAEYT>
- White, N. J., Ashley, E. a, Recht, J., Delves, M. J., Ruecker, A., Smithuis, F. M., ... Nosten, F. H. (2014). Assessment of therapeutic responses to gametocytocidal drugs in Plasmodium falciparum malaria. *Malaria Journal*, 13(1), 483. <http://doi.org/10.1186/1475-2875-13-483>

- White, N. J., & Pongtavornpinyo, W. (2003). The de novo selection of drug-resistant malaria parasites. *Proceedings of the Royal Society of London (Series B)*, 270(October 2002), 545–554. <http://doi.org/10.1098/rspb.2002.2241>
- White, N. J., Pukrittayakamee, S., & Hien, T. T. (2013). Malaria. *Lancet*, 22(3), 25–32. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60024-0](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60024-0)
- Winskill, P., Carvalho, D. O., Capurro, M. L., & Alphey, L. (2015). Dispersal of Engineered Male *Aedes aegypti* Mosquitoes, 1–18. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004156>
- Wittlin, S., Elhabiri, M., Krieg, R., Jortzik, E., Goetz, A., Rahbari, M., ... Becker, K. (2017). Arylmethylamino steroids as antiparasitic agents. <http://doi.org/10.1038/ncomms14478>
- World Health Organization. (2015). World Malaria Report 2015. *Nature*, 284. <http://doi.org/ISBN 978 92 4 1564403>
- World Health Organization, White, N. J., Pukrittayakamee, S., Hien, T. T., Faiz, M. A., Mokuolu, O. a, & Dondorp, A. M. (2014). World Malaria Report 2014. *Lancet*, 383(9918), 165–176. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60024-0](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60024-0)

Propriétés antiparasitaires des benzyl-ménadiones :

Étude de leur mécanisme d'action et de leur potentiel à bloquer la transmission des parasites du paludisme au moustique vecteur *Anopheles gambiae*

La plasmodione est une benzylmenadione (bMD) qui a été désignée comme inhibiteur subversif de flavoenzymes. Ces enzymes utilisent FAD comme co-facteur et sont impliquées dans de nombreux processus biologiques, et notamment dans le maintien de l'homéostasie redox par les systèmes thiorédoxine et glutathion. La plasmodione présente une forte activité contre *P. falciparum in vitro*, elle est active sur tous les stades asexués, préférentiellement sur les stades anneaux, avec une vitesse d'élimination des parasites très rapide. Mon objectif a été de tester sa capacité à bloquer la transmission du parasite murin au moustique et de contribuer à déterminer son mode d'action. Pour ce faire, j'ai dans un premier temps mis au point de nouveaux protocoles. Mes résultats ont démontré que (i) la plasmodione réduit le développement du parasite *in vivo* et limite la transmission du parasite au moustique en agissant sur tous les stades parasitaires sexués infectieux pour le moustique ; (ii) qu'un dérivé de la même famille, plus soluble, est beaucoup plus efficace, notamment sur les stades sexués et la transmission ; (iii) que lorsqu'ils sont délivrés directement au moustique, il n'y a aucun effet du bleu de méthylène ou de la plasmodione sur la survie des moustiques ; (iv) enfin en utilisant des parasites invalidés pour la GR, la GS, la γ GCS ou la GluPho, mes résultats suggèrent que le modèle d'action proposé des bMDs est à revoir, et que d'autres flavoenzymes pourraient être la cible.

Mots clés : 3-benzyl-ménadiones substituées, antipaludique, bloqueurs de transmission, *Plasmodium*, *A. gambiae*

Plasmodione is a benzylmenadione, synthesized as a flavoenzyme inhibitor. These enzymes use FAD as a cofactor and are involved in numerous biologic processes, including the regulation of the redox equilibrium through thioredoxin and glutathione metabolisms. Plasmodione is very efficient *in vitro* against all stages of the human parasite *P. falciparum*, especially on ring stages, and is a fast killer. The aims of my PhD were to monitor the ability of Plasmodione to block parasite transmission to mosquitoes and to characterize its mode of action. For that, I had to implement new protocols. My results showed (i) that Plasmodione decrease both the parasite development *in vivo* and its transmission to mosquitoes while acting on every sexual stage infectious for the mosquito. (ii) A derivative from the same chemical family, more soluble, is more efficient than Plasmodione, especially on asexual stages and on transmission. (iii) When compounds are directly delivered into mosquitoes, neither methylene blue or Plasmodione have an effect on the survival. (iv) Finally, the use of knock out parasites for the GR, GS, γ GCS or GluPho genes suggest that the proposed mode of action of the benzylmenadiones has to be corrected and other flavoenzymes could be targeted rather than GR.

Key words: substituted 3-benzyl-menadiones, antimalarial, transmission-blocking, *Plasmodium*, *A. gambiae*