



**HAL**  
open science

# Traitement d'urgence du paludisme sévère chez l'enfant par application intranasale d'artésunate

Yobouet Inès Kouakou

► **To cite this version:**

Yobouet Inès Kouakou. Traitement d'urgence du paludisme sévère chez l'enfant par application intranasale d'artésunate. Parasitologie. Université de Lyon, 2022. Français. NNT : 2022LYSE1008 . tel-04219614

**HAL Id: tel-04219614**

**<https://theses.hal.science/tel-04219614>**

Submitted on 27 Sep 2023

**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.



N°d'ordre NNT : 2022LYSE1008

**THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**  
opérée au sein de  
**l'Université Claude Bernard Lyon 1**

**Ecole Doctorale N° 205**  
**Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé**

**Spécialité de doctorat** : Micro-organismes, infections, innovation thérapeutique,  
santé publique

**Discipline** : Parasitologie

Soutenue publiquement le 21/01/2022, par :

**Yobouet Inès A. Kouakou**

---

**Traitement d'urgence du paludisme  
sévère chez l'enfant par application  
intranasale d'artésunate**

---

Devant le jury composé de :

ARIEY Frédéric, Professeur, HDR, Université Paris Descartes, France  
BERRY Antoine, Professeur, HDR, Université de Toulouse III, France  
MERCCKX Anais, HDR, Université Paris Descartes, France  
Valérie, HDR, IRD Bordeaux, France  
MAUCORT-BOULCH Delphine, Professeure, HDR, UCBL, France  
PICOT Stéphane, Professeur, HDR, UCBL, France

Rapporteur  
Rapporteur  
Rapporteuse  
Examinatrice  
Présidente  
Directeur de thèse

# **Université Claude Bernard – LYON 1**

|   |                        |
|---|------------------------|
| Président de l'Université                                       | M. Frédéric FLEURY     |
| Président du Conseil Académique                                 | M. Hamda BEN HADID     |
| Vice-Président du Conseil d'Administration                      | M. Didier REVEL        |
| Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire | M. Philippe CHEVALLIER |
| Vice-Président de la Commission de Recherche                    | M. Petru MIRONESCU     |
| Directeur Général des Services                                  | M. Pierre ROLLAND      |

## **COMPOSANTES SANTE**

|   |  |
|---|--|
| Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine | Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT     |
| Faculté d'Odontologie   | Doyenne : Mme Dominique SEUX           |
| Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux        | Doyenne : Mme Carole BURILLON          |
| Faculté de Médecine Lyon-Est  | Doyen : M. Gilles RODE                 |
| Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)       | Directeur : M. Xavier PERROT           |
| Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)         | Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA |

## **COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE**

|   |   |
|---|---|
| Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)                          | Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO                 |
| Département Informatique  | Directeur : M. Behzad SHARIAT                     |
| Département Mécanique   | Directeur M. Marc BUFFAT                          |
| Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)               | Directeur : Gérard PIGNAULT                       |
| Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)                       | Directeur : M. Nicolas LEBOISNE                   |
| Institut National du Professorat et de l'Education                          | Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON   |
| Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1                             | Directeur : M. Christophe VITON                   |
| Observatoire de Lyon  | Directrice : Mme Isabelle DANIEL                  |
| Polytechnique Lyon  | Directeur : Emmanuel PERRIN                       |
| UFR Biosciences   | Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER |
| UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS) | Directeur : M. Yannick VANPOULLE                  |
| UFR Faculté des Sciences  | Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI                  |

## RÉSUMÉ

La lutte contre le paludisme a connu une période de grâce qui a débuté dans les années 1990. L'augmentation des fonds alloués à la recherche, le développement de nouvelles méthodes d'intervention préventives, diagnostiques et curatives ainsi que leur déploiement dans les pays endémiques ont contribué à ce succès. Cependant, Dès 2017, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) sonnait l'alerte du ralentissement des progrès dans son rapport annuel. Aujourd'hui, la résistance de *Plasmodium falciparum* aux dérivés de l'artémisinine, la diminution des financements pour la recherche et les difficultés d'accès aux méthodes de lutte contre la maladie, notamment en période de pandémie Covid19, exposent les populations précaires en zones d'endémie au regain de la maladie. Dans l'attente de nouvelles thérapies, il devient urgent d'optimiser l'utilisation des méthodes d'intervention encore à disposition et de garantir leur accès aux populations à risque. Ce travail de thèse a été l'occasion d'explorer l'optimisation de traitements antipaludiques utilisant l'artésunate, dérivé de l'artémisinine à utilisation large et faiblement iatrogène.

Dans les zones rurales des pays endémiques, les difficultés d'accès aux centres de soins sont en partie responsables des taux élevés de mortalité et de morbidité du paludisme. L'OMS recommande d'administrer un suppositoire d'artésunate aux jeunes enfants en cas de suspicion de paludisme sévère avant de les transporter vers la structure de soins la plus proche. L'adhésion à ce traitement de pré-transfert est encore très limitée en zones d'endémie. Elle est notamment confrontée à des problèmes d'approvisionnement, de stockage et parfois de perception négative de la voie rectale. Ce traitement a fait ses preuves dans la réduction de la mortalité et de la morbidité du paludisme. Son accès doit être garanti à tous ceux qui en ont besoin. Dans ce travail de thèse, nous avons pour objectif principal d'étudier, *in vitro*, le potentiel de la voie nasale comme voie d'administration alternative du traitement de pré-transfert du paludisme sévère. Nous avons démontré la non-toxicité de deux formulations d'artésunate sur le modèle RPMI 2650 de muqueuse nasale humaine. La perméation de l'artésunate sur ce même modèle s'est cependant avérée faible et pourrait être améliorée par le développement de formulations galéniques optimisées pour voie nasale.

Nous avons aussi réalisé une revue de la pharmacocinétique de l'artésunate qui nous a permis de confirmer sa variabilité interindividuelle et inter-études importante. Cette étude a mis en évidence que l'exposition systémique à l'artésunate et à son métabolite, la dihydroartémisinine, augmente avec la dose d'artésunate après traitement par voie intraveineuse et orale. Dans le contexte de l'émergence de résistances aux dérivés de

l'artémisinine, l'augmentation des doses, si elle s'accompagne d'une meilleure clairance parasitaire *in vivo*, pourrait limiter le risque de sélection de clones résistants de *Plasmodium falciparum*. Des études supplémentaires doivent encore être réalisées pour conclure définitivement sur la relation entre augmentation de l'exposition sanguine à l'artésunate et clairance parasitaire.

Enfin, nous avons travaillé sur le développement de deux méthodes simples et peu coûteuses de dosage de l'artésunate, utilisables même dans des laboratoires à ressources limitées.

**Mots clés :** paludisme ; artésunate ; résistance ; pharmacocinétique ; traitement de pré-transfert ; voie nasale ; perméation ; dosage biologique.

## ABSTRACT

The fight against malaria has enjoyed a period of grace that started in the 1990s. Increased research fundings, the development of new preventive, diagnostic, and curative methods, and their deployment in endemic countries have contributed to this success. However, in 2017, the World Health Organization (WHO) reported the slowing of the progresses in its annual report. Today, *Plasmodium falciparum*'s resistance to artemisinin derivatives, decreased funding for research, and difficulties in accessing methods to fight the disease, especially during the Covid19 pandemic, expose precarious populations in endemic areas to the resurgence of the disease. While waiting for new therapies, it is becoming urgent to optimize the use of the intervention methods still available and to guarantee their access to the populations at risk. This thesis was an opportunity to explore the optimization of antimalarial treatments using artesunate, a widely used artemisinin derivative with low iatrogenicity.

In rural areas of endemic countries, difficulties in accessing health facilities are partly responsible for the high mortality and morbidity rates of malaria. WHO recommends that young children with suspected severe malaria be given an artesunate suppository before being transported to the nearest health facility. Adherence to this pre-referral treatment is still very limited in endemic areas where it faces problems of supply, storage, and sometimes negative perceptions of the rectal route. This treatment has been proven to reduce malaria mortality and morbidity. Its access must be guaranteed to all those who need it. In this thesis, our main objective was to study, *in vitro*, the potential of the nasal route as an alternative dosing route for severe malaria pre-referral treatment. We have demonstrated the non-toxicity of two artesunate formulations on the RPMI 2650 model, a human nasal mucosa model. However, the permeation of artesunate on this model proved to be low and could be improved by the development of galenic formulations optimized for the nasal route.

We also performed a review of the pharmacokinetics of artesunate which allowed us to confirm its significant inter-individual and inter-study variability. This study showed that the systemic exposure to artesunate and its metabolite, dihydroartemisinin, increases with the dose of artesunate after intravenous and oral treatment. In the context of the emergence of resistance to artemisinin derivatives, increasing doses, if accompanied by improved parasite clearance *in vivo*, could limit the risk of selection of resistant *Plasmodium falciparum* clones. Further studies are still needed to definitively conclude on the relationship between increased artesunate blood exposure and parasite clearance.

Finally, we worked on the development of two simple and inexpensive artesunate assay methods that can be used even in resource-limited laboratories.

**Keywords :** Malaria ; artesunate ; resistance ; pharmacokinetics; pre-referral treatment; nasal route ; permeation ; bioassay.

## REMERCIEMENTS

*Je remercie tout d'abord le bon Dieu de m'avoir soutenue tout au long de mon parcours et de permettre sa consécration par la soutenance de cette thèse.*

### **Aux rapporteurs et membres du jury**

Pr Frédéric ARIEY

Pr Antoine BERRY

Dr Valérie BRIAND

Pr Delphine MAUCORT-BOULCH

Dr Anais MERCKX

Merci infiniment à vous d'avoir accepté aussi vite de juger ce travail, malgré les grosses contraintes de temps que vous imposent vos carrières respectives.

### **Au Professeur Stéphane PICOT,**

Vous m'avez accueillie dans votre équipe avec bienveillance et avez tout de suite su me mettre en confiance. Je n'ai manqué de rien, que ce soit en matière de moyens techniques, scientifiques et humains ni de soutien émotionnel. Les choses n'ont pas toujours été faciles, notamment à cause de la Covid19. Mais grâce à vos encouragements, votre esprit scientifique et votre encadrement, ce travail a pu voir le jour. Je vous suis infiniment reconnaissante de m'avoir donné la chance d'intégrer votre équipe !

### **Au Dr Anne-Lise BIENVENU**

Merci beaucoup pour ton accueil chaleureux au sein de l'équipe, pour ta bonne humeur à toute épreuve et tes encouragements ! Tes conseils scientifiques et humains avisés m'ont énormément aidée dans la réalisation de ce travail et dans ma construction en tant que scientifique.

### **À tous mes collègues de la Malaria Research Unit (ICBMS UMR 5246 SMITH)**

À Adeline Lavoignat, Guillaume Bonnot et Régine Ferreira : merci pour votre accueil chaleureux au sein de l'équipe, pour votre soutien constant et vos conseils. Merci de m'avoir transmis votre savoir scientifique et technique.



À Roukayatou Omorou et Ibrahim Bin Said : merci pour le soutien moral, technique et scientifique que vous m'avez apporté. Votre optimisme m'a permis de garder la tête hors de l'eau dans les moments les plus difficiles de ce travail.

**À ma Mère et mon Père, Jocelyne et Denis**

Je ne pourrais jamais vous remercier assez pour tous les sacrifices que vous avez faits pour que je puisse m'épanouir. Merci pour votre amour, votre soutien, pour vos mots réconfortants qui m'ont accompagnée tout au long de ce parcours. La distance a parfois été dure à surmonter mais nous avons réussi ! Je vous aime et vous dédie ce travail !

**A mes frères et sœurs,**

Cora, Marie-D, D. Alex, Marie-E et Sam, vous avez été chacun à votre niveau une source de motivation et de soutien exceptionnelle. Merci d'avoir toujours pris le temps de m'écouter, de relire mes papiers, et de me conseiller.

À vous, Mélanie, Marine, Imen, Aloïs, Nissay, Camélia, Antonin, qui m'avez soutenue depuis le début et qui n'avez jamais douté de moi.

Enfin, j'aimerais remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail. Il n'aurait pas pu être sans vous. Je voudrais vous témoigner toute ma gratitude.

# TABLE DES MATIÈRES

|  |           |
|--|-----------|
| RÉSUMÉ.....  | 2         |
| ABSTRACT .....   | 4         |
| REMERCIEMENTS .....  | 6         |
| ABRÉVIATIONS .....   | 10        |
| LISTE DES FIGURES.....   | 12        |
| INTRODUCTION.....  | 13        |
| I. ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....   | 15        |
| <b>A) Le paludisme .....</b>   | <b>15</b> |
| 1) Epidémiologie .....   | 15        |
| 2) Cycle parasitaire chez l'homme .....  | 16        |
| 3) Accès palustre simple.....  | 17        |
| 4) Accès palustre sévère .....   | 18        |
| 5) Paludisme gestationnel.....   | 19        |
| 6) Stratégies de lutte contre le paludisme .....   | 20        |
| 7) Moyens de contrôle du paludisme.....  | 20        |
| 8) Recherche de nouvelles méthodes d'intervention .....  | 26        |
| <b>B) Neuropaludisme .....</b>   | <b>30</b> |
| 1) Définition et épidémiologie du neuropaludisme .....   | 30        |
| 2) Physiopathologie du neuropaludisme.....   | 31        |
| 3) Manifestations cliniques et marqueurs de mauvais pronostic .....                            | 33        |
| 4) Mortalité et séquelles.....   | 36        |
| <b>C) La voie nasale pour l'administration du traitement de pré-transfert du paludisme....</b> | <b>36</b> |
| 1) Le traitement de pré-transfert intra-rectal du paludisme .....                              | 36        |
| 2) Pourquoi la voie nasale ?.....  | 39        |
| 3) Description anatomique et histologique de la cavité nasale .....                            | 40        |
| 4) Devenir d'un principe actif administré par voie nasale.....                                 | 42        |
| 5) Facteurs qui peuvent influencer la biodisponibilité du principe actif.....                  | 45        |
| 6) La formulation galénique : réponse aux contraintes de la voie nasale .....                  | 48        |
| II. PARTIE EXPÉRIMENTALE .....   | 51        |
| <b>1) Description de l'approche expérimentale .....</b>  | <b>51</b> |

|  |     |
|--|-----|
| 2) Article 1: « Systematic review of artesunate pharmacokinetics: Implication for treatment of resistant malaria » .....       | 54  |
| 3) Article 2 : «Assessment of quantitative and semi-quantitative methods of artesunate biological <i>in vitro</i> test » ..... | 69  |
| 4) Article 3: « An <i>in vitro</i> proof of concept study of a pre-referral nasal treatment for acute malaria » .....          | 85  |
| III. DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....  | 103 |
| RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....  | 112 |

## ABRÉVIATIONS

Ac : anticorps

ACT: artemisinin-based combination therapy

Ag : antigène

BHE : barrière hématoencéphalique

CARAMAL: Community Access to Rectal Artesunate for Malaria

CD36 : Cluster of Differentiation 36

CMC : clairance mucociliaire

DHA : dihydroartémisinine

DND : Drug for Neglected Diseases initiative

EMA : Agence Européenne du Médicament

EPCR : Endothelial Protein C Receptor

FDA : Food and Drug Administration

GSK : GlaxoSmithKline

HRP2 : Histidine Rich Protein-2

ICAM-1 : Intercellular Adhesion Molecule-1

IM: : intramusculaire

IN : intranasal(e)

IR : intrarectal(e)

IV : intraveineuse

LDH : Lactate déshydrogénase

LCR : liquide céphalorachidien

MM : masse molaire

MMV : Medicines for Malaria Venture

MRU : Malaria Research Unit

MVIP : Malaria Vaccine Implementation Programme

NF-kB : Nuclear Factor-kappa B

NO : Oxide Nitrique

NtB : nose to brain delivery

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

PA : principe actif

PAM : Pregnancy Associated Malaria

PAR1 : Protease Activated Receptor-1

PCa : Protéine C activée

PCR : Polymerase Chain Reaction

*Pf* : *Plasmodium falciparum*

*Pf* ATP-4 : *Plasmodium falciparum* ATPase de type 4

*Pf*EMP-1 : *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein-1

*Pf*HRP2 : *Plasmodium falciparum* Histidine Rich Protein-2

P-gp : glycoprotéine P

pGR : Globule Rouge parasité

PK : pharmacocinétique

*Pk* : *Plasmodium knowlesi*

*Pm*: *Plasmodium malariae*

*Po* : *Plasmodium ovale*

PTF: pré-transfert

*Pv* : *Plasmodium vivax*

Rho-A : Ras homolog family member A

RSA : Ring-Stage Survival Assay

SDRA : syndrome de détresse respiratoire aiguë

SNC : Système Nerveux Central

TEER : résistance électrique transépithéliale

TDR : Test de diagnostic rapide

TPS : Traitement Préventif Saisonnier

VCAM-1 : Vascular Adhesion Molecule-1

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

WANECAM: West African Network for Clinical Trials of Antimalarial drugs

## LISTE DES FIGURES

|  |    |
|--|----|
| Figure 1. Cycle de développement de <i>Plasmodium spp</i> chez l'homme .....   | 17 |
| Figure 2. Trophozoïtes jeunes de (a) <i>Plasmodium vivax</i> et (b) <i>Plasmodium falciparum</i> .....                         | 22 |
| Figure 3. Trophozoïtes de <i>Plasmodium malariae</i> .....   | 22 |
| Figure 4. Pays ayant approuvés l'administration intra-rectale d'artésunate dans leurs directives nationales de traitement..... | 38 |
| Figure 5. Structure chimique de l'artésunate .....   | 50 |
| Figure 6. Structure chimique de la DHA.....  | 50 |

## INTRODUCTION

Le paludisme est un enjeu de santé publique et un frein majeur au développement des pays où il est endémique(1). Plus de 85% des cas de paludisme et la quasi-totalité des cas mortels (90%) sont recensés en Afrique subsaharienne où les jeunes enfants (< 5 ans) en payent le plus lourd tribut(2). En 2019, ces derniers ont représenté 67% des décès imputables au paludisme dans le monde(3). Grâce aux moyens d'intervention mis en place durant les années 1990, la lutte contre le paludisme a connu une période de grâce marquée par un recul notable de la maladie dans le monde. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime ainsi que 1,5 milliards de cas et plus de 7 millions de décès ont pu être évités durant les deux dernières décennies, la majorité d'entre eux en Afrique subsaharienne(4). Plus de 30 pays et territoires sont de plus aujourd'hui certifiés exempts de la maladie(5). Cependant, les avancées dans la lutte contre le paludisme stagnent depuis 2017 et certains pays où la charge de la maladie est encore élevée commencent à perdre du terrain. Ce constat est d'autant plus alarmant depuis l'émergence de résistances aux dérivés de l'artémisinine et aux pyréthrinoïdes, piliers de la prise en charge curative et préventive du paludisme. La découverte de nouvelles stratégies d'intervention est désormais cruciale pour conserver les avancées de la lutte contre le paludisme et atteindre, à terme, l'éradication de la maladie(4).

Dans l'attente de ces nouvelles thérapies, de nouvelles interventions peuvent être développées en optimisant les ressources déjà à disposition. Il est nécessaire par exemple d'améliorer l'accès aux soins aux populations les plus pauvres. La maladie tue essentiellement en zone rurale, là où les difficultés d'accès aux hôpitaux entraînent des retards dans l'instauration des traitements(6). Chez l'enfant de moins de 6 ans qui présente des symptômes évocateurs du paludisme sévère et qui ne peut pas être traité par voie orale, l'OMS recommande l'administration intra-rectale de suppositoires d'artésunate(4,7). Ce traitement dit de « pré-transfert » permet de prévenir la dégradation de l'état du patient pendant le trajet jusqu'à un centre de soins adapté pour sa prise en charge. La voie rectale (IR) présente cependant de nombreuses limites qui peuvent restreindre l'utilisation de ce traitement de pré-transfert. En fonction de leurs compositions, les suppositoires peuvent se ramollir sous les fortes températures des zones d'endémie, complexifiant le passage du sphincter anal et favorisant les risques de sous-dosage (8,9). Chez le jeune enfant, une expulsion du suppositoire est possible et la résorption intestinale s'accompagne d'une variabilité interindividuelle non négligeable(10–12). Enfin, une perception culturelle négative de la voie IR peut compromettre

l'adhésion de certaines populations à ce traitement(10,12). Toutes ces contraintes sont autant d'arguments en faveur de l'exploration d'autres voies d'administration du traitement de pré-transfert du paludisme.

Une étude préliminaire réalisée au sein de la Malaria Research Unit (MRU, ICMBS UMR 5246, Equipe SMITH) s'est intéressée à la voie nasale (IN) pour le traitement du neuropaludisme sur modèle murin(12). Elle a démontré l'efficacité de cette voie d'administration dans le traitement précoce (prévention des complications) et tardif (rémission) de souris impaludées. Ces résultats obtenus sur modèle animal ne sont pas directement transposables chez l'homme. Ils constituent cependant une preuve de concept en faveur de l'utilisation de la voie IN pour l'administration d'un traitement du paludisme sévère.

Ainsi, les travaux de recherche de ce projet de thèse s'inscrivent en direct continuité de ces premiers résultats. L'objectif principal a été de réaliser une évaluation *in vitro* du potentiel de la voie IN comme voie alternative d'administration du traitement de pré-transfert du paludisme.



# I. ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

## A) Le paludisme

### 1) Epidémiologie

Il existe de nombreuses espèces de *Plasmodium* parmi lesquelles six sont pathogènes pour l'homme : il s'agit de *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium ovale curtisi*, *Plasmodium ovale wallikeri* et *Plasmodium malariae*(13,14). Les trois premières espèces dominent l'actualité dans la recherche autour du paludisme pour différentes raisons.

*Plasmodium falciparum* (*Pf*) est l'espèce la plus représentée à travers le monde, mais aussi celle qui engendre la très grande majorité des accès palustres graves et des décès(2). En 2018, elle a été responsable de 99,7 % des cas estimés de paludisme en Afrique, de 50 % des cas en Asie du Sud-Est, de 71 % des cas en Méditerranée orientale et de 65 % des cas dans le Pacifique occidental(3). Sa forte pathogénicité repose sur une propriété qui semble lui être propre : sa capacité à se séquestrer dans la microvasculature des organes profonds. De fait, cette propriété n'a, à l'heure actuelle, pas été formellement mise en évidence chez les autres espèces pathogènes pour l'homme.

*Plasmodium vivax* (*Pv*) est l'espèce prédominante dans les régions impaludées d'Amérique où elle a été à l'origine de 75% des cas de paludisme en 2018(3). Elle a longtemps été considérée comme responsable d'accès palustres simples uniquement mais les récentes études tendent à prouver qu'elle peut aussi induire des formes sévères potentiellement mortelles(15–17). Comme l'espèce *ovale* (*Po*), elle peut être à l'origine de rechutes d'épisodes infectieux plusieurs mois voire années après l'exposition initiale du fait de sa persistance dans le foie sous une forme dormante appelée hypnozoïte(18,19). A l'heure actuelle, il n'existe aucun test qui permette de mettre en évidence ces formes dormantes.

Enfin, *Plasmodium knowlesi* (*Pk*) est responsable du paludisme chez les macaques à longue queue d'Asie du Sud-Est. Cette espèce est transmissible du singe à l'homme, artificiellement ou naturellement, et peut entraîner des accès palustres graves(20,21).

L'intensité de la transmission du parasite varie d'une région à l'autre et découle de plusieurs paramètres comme (i) la robustesse du moustique vecteur vis-à-vis de son écosystème, (ii) sa durée de vie, (iii) sa vitesse de reproduction ou encore (iv) son anthropophilie(2). On

distingue ainsi des zones géographiques à forte transmission parasitaire et d'autres à transmission saisonnière voire épisodique(1,2).

Dans les zones géographiques à forte transmission parasitaire, le taux d'inoculation entomologique peut être très élevé (jusqu'à 1000 piqûres infectantes par personne et par an)(2,22). C'est le cas notamment en Afrique subsaharienne. L'exposition intense, répétée et prolongée au parasite durant les premières années de vie permet le développement d'une immunité partielle appelée « prémunition » en cas de survie. Cette immunité se traduit par une protection vis-à-vis des accès graves chez l'enfant en croissance et par la quasi-disparition des accès palustres symptomatiques à l'âge adulte malgré une parasitémie souvent positive(1,2,23). Ces porteurs sains constituent néanmoins un réservoir parasitaire qui entretient la persistance de *Plasmodium spp* au sein des populations et peuvent représenter jusqu'à 50% des individus de ces zones(1,24). Chez les jeunes enfants qui n'ont pas encore acquis cet état de prémunition (< 5 ans), la mortalité et la morbidité du paludisme sont donc importantes. Cet état de tolérance immunitaire est de plus aussi instable qu'il est difficile à acquérir : il est admis qu'il se perd progressivement en cas de rupture prolongée de l'exposition au parasite(25). Une étude a constaté la persistance d'une prémunition chez des individus originaires d'Afrique subsaharienne jusqu'à au moins 4 ans après leur établissement en France métropolitaine(26).

Dans les zones à intensité de transmission modérée, l'acquisition de l'état de prémunition est plus lente. Des accès pernicioeux peuvent alors survenir chez les grands enfants(27). Enfin, dans les zones à faible transmission, l'état de prémunition n'est jamais acquis : les cas symptomatiques simples et graves peuvent survenir à n'importe quel âge. La plupart des zones impaludées d'Asie et d'Amérique Centrale et du Sud en font partie(1,2,27).

## 2) Cycle parasitaire chez l'homme

Le paludisme se transmet à l'homme lors du repas de sang d'une anophèle femelle (Figure 1). Des sporozoïtes de *Plasmodium spp* sont injectés dans le derme d'où ils migrent vers le foie par voie sanguine (1). Le parasite pénètre ensuite dans des hépatocytes et s'enferme dans une vacuole parasitophore (2). Il y entame une première étape de différenciation et de multiplication asexuée intense (schizogonie intra-hépatique) : c'est le cycle exo-érythrocytaire (A). Cette étape du cycle parasitaire chez l'hôte humain est asymptomatique et ne permet pas la mise en place d'une réponse immunitaire efficace(19).

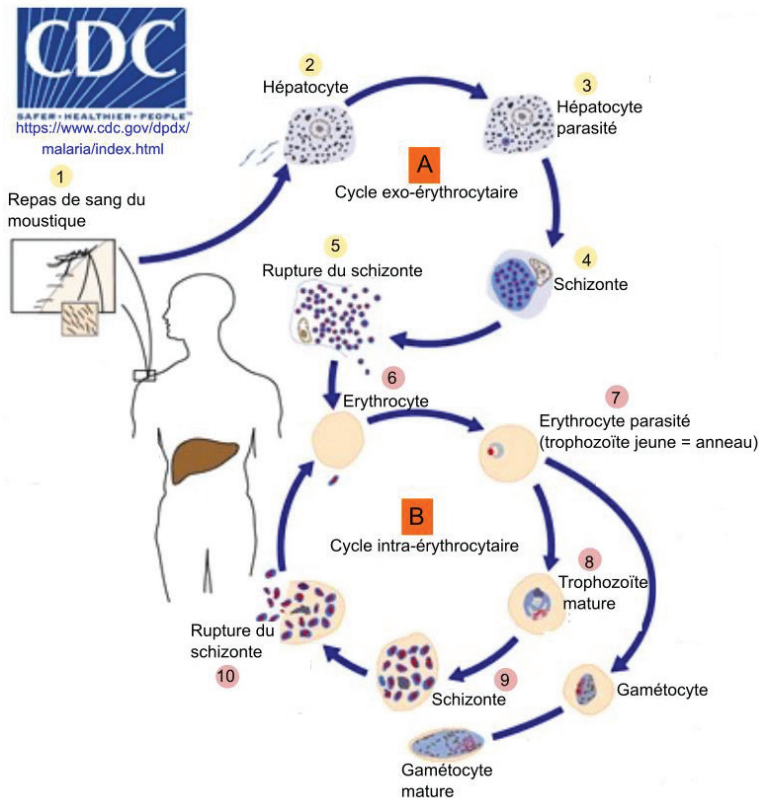


Figure 1. Cycle de développement de *Plasmodium spp* chez l'homme (modifiée)(28)

Cinq à six jours après la piqûre infectante, les schizontes hépatiques se rompent et libèrent des mérozoïtes dans la circulation sanguine(5). Ces mérozoïtes pénètrent à l'intérieur d'érythrocytes circulants où ils se différencient et se multiplient à leur tour de manière asexuée (schizogonie intra-érythrocytaire) dans le cadre du cycle intra-érythrocytaire (B). La rupture des schizontes érythrocytaires entraîne la libération de nouveaux mérozoïtes qui iront à leur tour parasiter d'autres globules rouges(10). C'est la perpétuation des cycles intra-érythrocytaires qui est à l'origine des manifestations cliniques du paludisme. Elle s'accompagne d'une multiplication exponentielle du parasite, d'une sur-destruction des globules rouges par lyse et élimination splénique accélérée, ainsi que de la libération de déchets pyrogènes du métabolisme parasitaire (ex : hémotoïne).

### 3) Accès palustre simple

Dans sa forme simple, le paludisme présente une symptomatologie très diverse et aspécifique pouvant associer de nombreux symptômes comme fièvre, frissons, sueurs, céphalées, myalgies, arthralgies ou encore des symptômes digestifs (douleurs abdominales, vomissements)(2). L'infection peut se présenter sous la forme d'accès rythmés de fièvre,

frissons et de sueurs coïncidant avec l'initiation et la fin des cycles intra-érythrocytaires. On observe ainsi des fièvres tierces, survenant toutes les 48 h, pour les espèces *falciparum*, *vivax* et *ovale*, et des fièvres quartes, survenant toutes les 72 h, pour l'espèce *malariae*(2,18). Cette forme simple, qui représente la grande majorité des accès palustres, se traite efficacement avec les thérapeutiques antipaludiques actuelles. Elle peut cependant se compliquer en terrains favorables (absence d'état de prémunition, immunodépression physiologique ou médicamenteuse, infections répétées) ou en cas de retard ou d'absence de prise en charge adéquate. Elle pourra ainsi évoluer vers un accès palustre sévère(19).

#### 4) Accès palustre sévère

Plusieurs types de complications peuvent être observées dans le cadre du paludisme grave. Elles pourront toucher préférentiellement différentes tranches d'âges et/ou différentes populations, en fonction notamment de leur niveau d'exposition au parasite(19).

Chez les enfants des zones d'endémie à forte transmission parasitaire, le paludisme sévère est essentiellement caractérisé par trois complications qui surviennent généralement de manière isolée mais qui peuvent aussi se conjuguer entre elles : l'anémie sévère, le neuropaludisme et la détresse respiratoire(18,19). L'anémie sévère est la principale manifestation du paludisme sévère chez les jeunes enfants non-prémunis ( $\leq 2$  ans). Bien que la physiopathologie de cette anémie n'ait pas encore été totalement élucidée, elle serait causée par l'association de la destruction accélérée des globules rouges parasités et des globules rouges sains (élimination splénique) et d'une dysrégulation de l'érythropoïèse du fait de la répétition des accès palustres dans le temps(2,18). La détresse respiratoire est consécutive à une acidose métabolique (hyperlactatémie) ou à un neuropaludisme. L'acidose qui est une cause importante de décès peut être associée à une hypoglycémie qui assombrit son pronostic(2). Quant au neuropaludisme, complication cérébrale du paludisme, il se présente souvent de manière isolée chez l'enfant. Il sera décrit de manière approfondie dans une autre partie.

Chez l'adulte, le paludisme sévère se présente sous la forme d'un syndrome de défaillance multiviscérale pouvant associer une atteinte pulmonaire (œdème), une insuffisance rénale aiguë, une insuffisance hépatique, un neuropaludisme et bien d'autres symptômes(2,18,19). Les atteintes hépatiques et rénales sont souvent marquées. Ce sont principalement les adultes non-prémunis qui développeront des formes sévères de paludisme(19).

## 5) Paludisme gestationnel

Le paludisme gestationnel ou Pregnancy-associated Malaria (PAM) en anglais correspond à l'infection d'une femme enceinte par *Plasmodium spp*. Il s'agit d'une situation clinique à part entière dans l'épidémiologie du paludisme. Il entraîne des répercussions différentes sur la mère et sur l'enfant à naître(29).

*Plasmodium falciparum*, en se séquestrant dans le placenta (paludisme placentaire), perturbe son homéostasie et impacte négativement le développement de l'embryon ou du fœtus. L'enfant à naître est ainsi exposé au paludisme *in utero*(2). L'acquisition par la mère d'une immunité spécifique lors des premiers accès de paludisme gestationnel permet une diminution de l'intensité des répercussions sur l'enfant lors des grossesses suivantes par transfert plus important d'anticorps protecteurs de la mère à l'enfant(30,31). L'intensité de ces répercussions pourrait aussi être influencée par le moment de l'infection de la mère ; les parasitémies semblent en effet plus importantes durant les deux premiers trimestres de grossesse(32–34).

Chez la femme enceinte qui vit en zone de forte transmission parasitaire, l'acquisition de l'état de prémunition durant l'enfance la protège des accès cliniques. Même si on observe une exacerbation de son anémie gestationnelle, elle demeure généralement asymptomatique. Les femmes enceintes non-prémunies sont quant à elles à haut risque de développement de formes sévères du paludisme avec une mortalité importante (jusqu'à 50%). Elles représentent par ailleurs les principales victimes du paludisme grave dans les zones à faible transmission de *Plasmodium spp*(2).

Chez l'enfant à naître, le PAM est notamment associé à un petit poids de naissance (< 2,5 kg) en lien avec un retard de croissance *in utero*, à des avortements spontanés, des décès à la naissance, à des anémies fœtales, à l'augmentation de la fréquence des accès palustres durant l'enfance, à la survenue précoce des premiers accès palustres et au développement du paludisme congénital(29,30,35–39).

L'infection par *Pv* durant la grossesse entraînent rarement des accès sévères(2). Bien qu'aucune séquestration placentaire intense n'ait été démontrée, on observe tout de même une diminution du poids de naissance de 107 g en moyenne ainsi qu'un risque augmenté de survenue d'avortements spontanés(2,40). Le risque de décès du nourrisson est important lorsque le paludisme gestationnel survient à l'approche du terme(41).

## 6) Stratégies de lutte contre le paludisme

Le paludisme est une maladie au coût humain et économique important(42). Le succès en demi-teinte de la première campagne d'éradication lancée par l'OMS en 1955 (faible impact en Afrique), a conduit à l'établissement d'un nouveau programme de lutte mondiale : ***la stratégie technique mondiale de lutte contre le paludisme***(43,44). A terme, ce programme a pour but de tendre vers l'éradication de la maladie dans les régions encore impaludées. Pour cela, il est nécessaire de (i) persévérer dans l'utilisation des moyens de contrôle actuels de la maladie, (ii) stimuler la recherche autour de nouvelles méthodes d'intervention et (iii) garantir l'accès à ces interventions à toutes les populations exposées au paludisme.

## 7) Moyens de contrôle du paludisme

Le contrôle de la maladie associe trois grands axes d'action : la prévention de la transmission du parasite et/ou de la survenue du paludisme maladie, le diagnostic précoce et le traitement des cas de paludismes avérés.

### **Lutte antivectorielle**

Dans les pays endémiques, l'axe préventif repose essentiellement sur la lutte contre le moustique vecteur du genre *Anopheles*. L'utilisation à grande échelle des moustiquaires imprégnées et la pulvérisation d'insecticides au sein des habitations ont permis de réduire la transmission de *Plasmodium spp* aux populations(45). En Afrique subsaharienne par exemple, l'utilisation de moustiquaires imprégnées a permis de réduire la mortalité toutes causes confondues de 20% chez les enfants de moins de cinq ans(46). Couplée à l'utilisation de thérapies anti-palustres nouvelles basées sur les dérivés de l'artémisinine, cette lutte vectorielle a permis de réduire la mortalité globale du paludisme de 60% à l'échelle mondiale et de 66% en Afrique entre les années 2000 et 2015 (47).

Ces méthodes de lutte vectorielle présentent cependant des limites. L'utilisation intempestive d'insecticides a entraîné l'émergence de résistances chez *Anopheles gambiae*, principal vecteur de la maladie en Afrique subsaharienne(2,45,48,49). Leur utilisation expose aussi les populations à de fortes concentrations de xénobiotiques potentiellement dangereux pour leur santé. L'efficacité de la prévention vectorielle dépend aussi du comportement des vecteurs locaux. Si *Anopheles Gambiae* prospère à l'intérieur des habitations où il pique

préférentiellement la nuit, d'autres espèces vectrices piquent à l'extérieur, au petit matin ou en début de soirée. Se prémunir de ces vecteurs s'avère alors plus difficile(2).

La lutte antivectorielle peut aussi passer par une élimination des eaux stagnantes à proximité des habitations pour porter directement atteinte au cycle de développement des moustiques. Cette stratégie reste compliquée à mettre en œuvre en zone rurale où les villages sont généralement encrés à proximité de points d'eau douce, écosystèmes favorables à la prolifération des moustiques.

### **Chimioprophylaxie**

En zone d'endémie palustre, la prophylaxie médicamenteuse est indiquée chez la femme enceinte. Il s'agit d'une thérapie intermittente, composée d'au moins trois cures complètes de l'association pyriméthamine – sulfadoxine. Elle confère une protection continue contre la maladie tout au long de la grossesse. L'émergence d'un phénomène de résistance vis-à-vis de cette association en Afrique vient renforcer l'urgence du développement de nouvelles molécules antipaludiques utilisables chez la femme enceinte(50). Un traitement préventif saisonnier (TPS) est quant à lui recommandé chez les enfants de 3 ans à 59 mois en Afrique subsaharienne. Il associe amodiaquine et pyriméthamine – sulfadoxine et est administré une fois par mois dès le début de la période de transmission saisonnière (quatre cures au maximum par an)(51,52).

La chimioprophylaxie est aussi recommandée chez les voyageurs non-prémunis qui se rendent en zone d'endémie. Sa composition médicamenteuse dépend de l'état physiologique du patient (femme enceinte), de la probabilité d'être infecté lors du voyage et de la sensibilité des espèces plasmodiales locales aux thérapies utilisées(2).

### **Diagnostic microscopique du paludisme**

Lorsque les mesures de préventions ont échoué et que l'accès palustre se déclare, il doit être diagnostiqué le plus rapidement possible puis traité pour prévenir sa complication. Le diagnostic parasitaire de certitude, associé à l'appréciation de l'état clinique du patient, est suffisant dans les accès simples mais doit être complété par un diagnostic biologique extensif dans les accès compliqués.

Le diagnostic parasitaire repose essentiellement sur deux examens microscopiques: le frottis sanguin et la goutte épaisse. La goutte-épaisse est une méthode très sensible qui permet de déterminer la charge parasitaire chez le patient (parasitémie). Le frottis sanguin permet quant-à-lui d'identifier la ou les espèces de *Plasmodium* impliquées(13). Il peut aussi permettre



de réaliser une première évaluation du pronostic via notamment l'appréciation de la proportion de neutrophiles mélanifères et celle des stades de développement parasitaire majoritaires. Dans les accès palustres sévères à *Pf*, la présence de stades parasitaires tardifs et/ou de plus de 5% de neutrophiles mélanifères sont de mauvais pronostic(53,54). Le diagnostic d'espèce par microscopie optique peut être compliqué dans les zones géographiques où plusieurs espèces sont endémiques. En Asie du Sud-Est par exemple, les formes anneaux précoces (ring) de *Pf*, *Pv* et *Pk* peuvent être confondues car elles sont morphologiquement proches (Figure 2). Il en est de même pour les trophozoïtes mûres de *Pk* et *Pm* (Figure 3)(13).

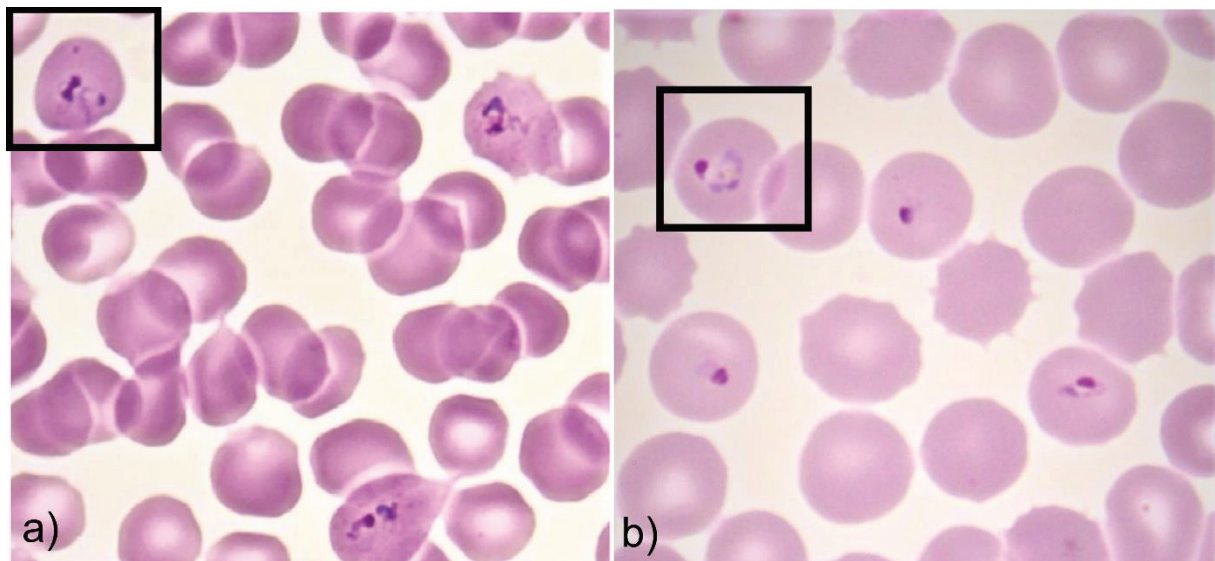


Figure 2. Trophozoïtes jeunes (anneaux, encadrés) de (a) *Plasmodium vivax* et (b) *Plasmodium falciparum* (modifiée)(14)

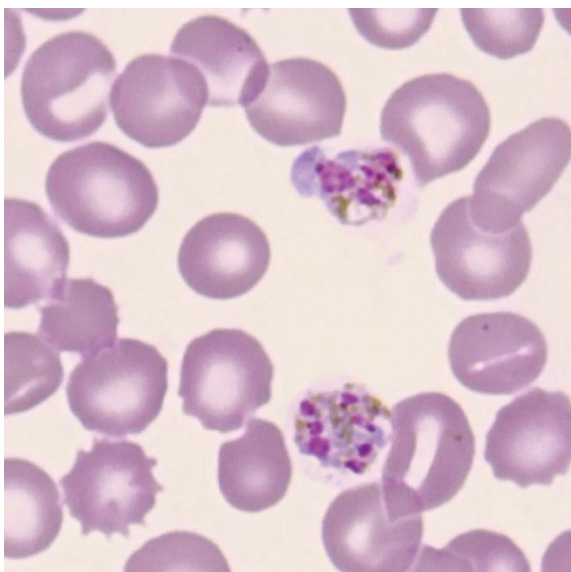


Figure 3. Trophozoïtes de *Plasmodium malariae* (modifiée)(14)



Un opérateur expérimenté est donc nécessaire pour le réaliser et le diagnostic d'espèce par analyse biomoléculaire (Polymerase chain reaction, PCR) doit être privilégié lorsque cela est possible. De plus, le diagnostic microscopique étant réalisé sur une goutte de sang périphérique, il est important de noter qu'il ne reflète pas forcément le climat parasitaire global du patient. L'interprétation de la parasitémie doit prendre en compte la zone géographique d'infection en ce qui concerne l'intensité de transmission parasitaire et les potentielles espèces impliquées (identifiées ou non sur un frottis). En effet, chez les patients non-immuns présentant les signes cliniques d'un accès palustre sévère, une faible parasitémie périphérique peut être le reflet d'une forte séquestration des globules rouges infectées dans les infections à *Pf* et ne doit pas être un critère rassurant pour le personnel médical(54,55).

### **Méthodes alternatives de diagnostic du paludisme**

Lorsque le diagnostic parasitaire par examens microscopiques est impossible à réaliser (pour défaut de matériel, de personnel qualifié ou lorsqu'il doit être réalisé dans l'urgence), il peut être remplacé par un test de diagnostic rapide (TDR). Basés sur le principe immunologique de l'interaction anticorps (Ac) – antigène (Ag), ces tests chromatographiques reconnaissent des Ag exprimés par les plasmodies présentes dans le sang. Ils peuvent être spécifiques d'espèces (*Pf* Lactate Déshydrogénase LDH, *Pf* Histidine-Rich Protein2 HRP2 ; *Pv*LDH ; *Pv*Aldolase) ou pan-spécifiques (*p*LDH, Aldolase)(56–58). Les TDRs sont faciles et rapides d'utilisation (résultats en 15 à 30 minutes), cependant, ils ne sont pas quantitatifs, leur sensibilité est variable (100 à 200 parasites/ $\mu$ l pour *Pf* et *Pv*, moins pour *Po* et *Pm*) et ils peuvent rester positifs longtemps après la guérison du fait de la clairance tardive des protéines qu'ils détectent(57). Les TDR *Pf*HRP2, par exemple, ont un seuil de détection moyen tournant autour de 200 parasites par  $\mu$ l de sang. Il en existe des versions ultrasensibles dont le seuil de détection varie entre deux à quatre parasites par  $\mu$ l(59). Ces tests restent positifs jusqu'à un mois après la guérison, présentent un effet crochet en cas de fortes parasitémies, et peuvent présenter des faux négatifs en cas de délétion du gène codant pour la protéine cible (*Pf*HRP2)(13,57,58,60).

### **Prise en charge médicamenteuse de l'accès palustre simple**

Le traitement de l'accès palustre doit être initié rapidement et le diagnostic de certitude ne doit pas conditionner sa mise en place. En cas de forte suspicion clinique de paludisme avec critère(s) de gravité ou risque de décompensation brutale chez les patients non-immuns, il est impératif de débiter le traitement avant le retour du diagnostic parasitaire et biologique.

La thérapie de première intention dans les accès palustres simples à *Pf* est une combinaison médicamenteuse qui associe un dérivé de l'artémisinine et un antipaludique à élimination plus lente. Cette association appelée ACT pour « *Artemisinin-based Combination Therapy* », peut être administrée à tous les patients sauf lors du premier trimestre de grossesse(13,61). Les dérivés de l'artémisinine (artemether, artésunate, dihydroartémisinine) entraînent une réduction rapide et importante de la parasitémie mais sont rapidement éliminés de l'organisme. La molécule associée a donc pour rôle d'éliminer les parasites résiduels qui subsistent de sorte à obtenir une clairance parasitaire totale et la guérison clinique. Certaines de ces molécules persistent longtemps dans l'organisme et confèrent ainsi une protection vis-à-vis des réinfections pendant plusieurs semaines (4 à 6) après la fin de la thérapie initiale (méfloquine, pipéraquline)(13). Le traitement ACT par voie orale est efficace, bien toléré et existe sous la forme d'associations fixes disponibles sur le marché(62). Le choix de la combinaison repose sur la sensibilité du parasite à l'antipaludique d'élimination lente et sur le risque d'échec thérapeutique qui peut être fonction de la zone géographique d'infection. Le traitement ACT est aussi efficace sur les autres espèces de *Plasmodium* infectant l'homme: il est donc utilisé en première intention dans les infections mixtes (qui impliquent plusieurs espèces) et en l'absence de confirmation de l'espèce ou des espèces en cause. Un traitement ACT à base de pipéraquline, méfloquine ou luméfántrine est à utiliser en première intention chez l'enfant et l'adulte dans les accès simples à *Pv*, *Po*, *Pm* et *Pk* en zones de chloroquinorésistance sauf contre-indications. Les infections à *Pv*, *Po* et *Pm* contractées dans des régions où la chimiosensibilité à la chloroquine est conservée sont traitées avec cette molécule en première intention(61).

L'utilisation de traitements antipaludiques autres que les ACT est toujours recommandée dans des situations bien définies. Ils peuvent notamment être utilisés en deuxième intention, après l'échec de l'ACT de première ligne (quinine – clindamycine, quinine – doxycycline) ou en première intention dans le traitement des accès simples lors du premier trimestre de grossesse (quinine – clindamycine pendant 7 jours)(61).

Le traitement des accès palustres non compliqués se fait essentiellement en ambulatoire. Si la réussite du traitement est menacée (traitement par voie orale impossible, risque de non-adhésion du patient au traitement, sous dosages...), la question de l'hospitalisation doit se poser. En effet, l'échec du traitement expose non seulement à la complication de la maladie, mais aussi à la sélection de souches plasmodiales résistantes. Le traitement antipaludique permet aussi de réduire la transmission du parasite en réduisant l'ampleur du réservoir parasitaire. Ainsi, dans les zones à faible transmission de *Plasmodium spp*, il est recommandé d'administrer un

traitement complémentaire à base de primaquine (une dose, 0,25 mg/kg) en fin de cure ACT des infections à *Pf*. Ce traitement a pour but de tuer les gamétocytes mûres, formes transmises au moustique vecteur. L'administration de primaquine dans les infections à *Pv* et *Po* permet aussi de détruire les éventuels hypnozoïtes hépatiques et de prévenir les rechutes à distance de l'infection initiale. Cette dernière thérapie est appelée « traitement radical » du paludisme à *Pv* et *Po*(61).

### **Prise en charge médicamenteuse de l'accès palustre grave**

L'accès palustre sévère est une urgence médicale. Il est toujours mortel en l'absence de traitement et dans 10 à 20% des cas lorsqu'il est correctement traité(13,63). Le paludisme sévère doit préférentiellement être pris en charge en unité de soins intensifs ou en réanimation. Son traitement associe un antipaludique par voie intraveineuse (IV) à une prise en charge symptomatique des perturbations du bilan biologique, métabolique et des déficits d'organes. Cette prise en charge est donc relativement complexe. Elle nécessite d'avoir accès à une structure de santé qui dispose de ressources médicales et humaines conséquentes pour pouvoir diagnostiquer et traiter efficacement les patients.

Le traitement de première ligne du paludisme sévère est l'artésunate par voie IV à raison de 2,4 mg/kg/dose (0, 12h, 24h) pendant les premières 24 heures suivi d'une administration journalière à la même dose. Cette dose est ramenée à 3 mg/kg chez les enfants pesant moins de 20 kg. En cas de non-disponibilité de l'artésunate, la prise en charge initiale par quinine IV est privilégiée. Le traitement parentéral doit être maintenu pendant au moins 24 heures. Passé cette période et dès lors que le patient est capable de s'alimenter et de s'hydrater par voie orale, un relais per os est à mettre en place, soit par une cure complète d'ACT, soit par un traitement non-ACT adapté(64). Le traitement par artésunate IV en première intention est recommandé par l'OMS depuis que deux études ont démontré sa supériorité vis-à-vis de la quinine IV dans la réduction de la mortalité dans les accès sévères. Cette diminution de la mortalité a été évaluée à 22% (IC95% 8,1 – 36,9) chez les enfants en Afrique subsaharienne et à 35% (IC95% 18,5 – 47,6) chez les adultes en Asie du sud-est(65,66). L'artésunate est de plus bien mieux toléré que la quinine qui peut engendrer des effets indésirables plus ou moins graves (hypoglycémie, hyper-insulinémie, hypotension, cardiotoxicité). Le traitement des infections graves à *Pv* doit inclure l'administration de primaquine pour l'élimination des potentiels hypnozoïtes hépatiques(13,64).

### **Dérivés de l'artémisinine pour le traitement du paludisme : la rançon de la gloire**

Le traitement du paludisme qu'il soit simple ou sévère repose ainsi sur l'utilisation des dérivés de l'artémisinine. La généralisation de leur utilisation, leur mésusage et la circulation de produits contrefaits sont aujourd'hui à l'origine de l'émergence de souches résistantes de *Pf*. Ce phénomène a été décrit pour la première fois dans l'ouest du Cambodge et dans les territoires situés à la frontière entre la Thaïlande et le Myanmar(67,68). La résistance aux dérivés de l'artémisinine se caractérise par un ralentissement de la clairance parasitaire après traitement par ACT ou par artésunate en monothérapie(69,70). Pour que la résistance soit considérée comme fixée au sein d'une population, deux critères doivent être retrouvés(71) :

- Critère 1 : 5% des infections au moins doivent présenter une mutation conférant résistance dans le gène Kelch13 de *Pf*(72,73)
- Critère 2 : une demi-vie de clairance parasitaire supérieure ou égale à 5 heures OU la persistance d'une parasitémie positive 3 jours ou plus après l'initiation du traitement.

La perte d'efficacité des dérivés de l'artémisinine ne semble pas encore menacer l'efficacité du traitement ACT lorsque *Pf* est toujours sensible à la molécule associée. Ce phénomène de résistance est aujourd'hui enraciné dans plusieurs pays d'Asie comme le Cambodge, le Laos, le Myanmar, la Thaïlande et le Vietnam(74). Des mutations sporadiques du gène Kelch13 ont aussi été retrouvées en Afrique (Rwanda)(4,13,70,75). L'apparition de souches plasmodiales résistantes en Afrique pourrait mener à une catastrophe sanitaire si des mesures strictes ne sont pas appliquées pour prévenir cette éventualité et/ou, le cas échéant, empêcher leur dissémination à grande échelle.

Nous venons ainsi de démontrer que le contrôle du paludisme en zones d'endémie n'est pas chose aisée. Les mesures de contrôle, correctement appliquées, ont permis de diviser le nombre de cas et de décès par deux(52). Cependant, les nombreuses faiblesses des différentes méthodes de prévention, de diagnostic et de traitement justifient le développement de nouvelles méthodes d'intervention si l'objectif de l'éradication du paludisme veut être atteint.

#### 8) Recherche de nouvelles méthodes d'intervention

##### **Prévention vaccinale**

De nombreux projets visant au développement de vaccins anti-palustres ont vu le jour depuis les années 1980, sans grand succès. Le meilleur candidat actuellement disponible est le vaccin Mosquirix® (RTS,S/AS01) en cours de développement par GlaxoSmithKline (GSK)

depuis 1987. Il s'agit d'un vaccin recombinant (RTS,S) avec adjuvant (AS01) et dirigé contre les sporozoïtes de *Pf*(76). Il agit en amont de la phase érythrocytaire, en empêchant *Pf* d'entamer sa phase de développement intra-hépatocytaire. Les premiers résultats cliniques de Mosquirix® sur population pédiatrique sont mitigés : faible réduction des accès symptomatiques (18 – 28% selon l'âge) sans réduction substantielle de la mortalité chez les patients vaccinés. La protection est de plus de courte durée, perdue dans l'année suivant la réalisation de la dose de rappel(76,77). En 2016 cependant, l'OMS autorise l'utilisation de Mosquirix® dans le cadre d'une étude pilote intitulée Malaria Vaccine Implementation Programme (MVIP). Elle a pour but d'évaluer l'efficacité et la tolérance du vaccin dans 3 pays d'Afrique subsaharienne (Ghana, Kenya et Malawi) et débute en Avril 2019(77–79). En octobre 2021, l'OMS recommande officiellement le déploiement à grande échelle de Mosquirix® pour la vaccination des enfants ( $\geq 5$  mois) vivant en zones de transmission modérée à intense de *Pf*(80). Les premiers résultats du MVIP, dans un contexte de maintien des autres mesures de contrôles du paludisme, sont en effet encourageants : introduction du vaccin réussie au sein des communautés, profil de tolérance favorable, pas d'impact négatif de l'introduction du vaccin sur les autres politiques de santé pédiatriques, réduction significative de survenue des formes graves du paludisme (30%) etc. Les résultats d'une récente étude, réalisée au Mali et au Burkina Faso, viennent corroborer ces résultats(81). Cette étude a évalué l'effet d'une prise en charge préventive utilisant la vaccination saisonnière avec Mosquirix® seule, le TPS seul et une combinaison des deux interventions sur la survenue d'accès cliniques de paludisme. Elle a conclu que (i) la vaccination saisonnière n'est pas inférieure au TPS pour prévenir le paludisme et (ii), la combinaison des deux interventions apporte une meilleure protection contre les formes cliniques et/ou mortelles de la maladie. Les résultats de ces différentes études démontrent que le véritable potentiel de ce vaccin réside dans son utilisation en association avec les mesures de contrôles déjà existantes : mesures préventives (TPS, lutte antivectorielle) et mesures curatives (diagnostic et traitement). Utilisé seul, il confère un niveau de protection insuffisant et expose les patients à des retards de diagnostic, de traitement et donc à des risques de décès en cas de paludisme grave. Le vaccin Mosquirix® n'est pas une révolution dans la lutte contre le paludisme, mais c'est un outil complémentaire qui doit maintenant trouver sa place parmi les interventions déjà existantes.

### **Développement de nouvelles thérapies antipaludiques**

L'émergence de résistances aux dérivés de l'artémisinine et la consolidation des résistances aux autres antipaludiques font de la découverte de nouveaux traitements un enjeu

majeur de santé publique. Des partenariats scientifiques comme le Medicines for Malaria Venture (MMV, 1999) et le Drugs for Neglected Diseases initiative (DND, 2003) permettent de stimuler la recherche autour du développement de nouveaux traitements(82–84). Les différents programmes de recherches qui en découlent rassemblent acteurs de l'industrie pharmaceutique et laboratoires académiques et sont essentiellement financés par des fonds publics et des dons. Il existe deux grandes stratégies pour développer ces nouveaux traitements. La première repose sur le repositionnement de médicaments antimicrobiens déjà commercialisés et qui possèdent un effet parasiticide plus ou moins marqué sur *Plasmodium spp.* Le cotrimoxazole, par exemple, pourrait être utilisé dans le traitement préventif du paludisme chez l'enfant séronégatif au VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine)(85,86). Cette stratégie aboutit à une augmentation du champs d'utilisation de ces molécules et peut être à l'origine d'une réduction d'efficacité sur leurs cibles initiales par sélection de résistances. La deuxième stratégie consiste à développer de nouvelles molécules antipaludiques à visées préventives et curatives. L'antipaludique idéal est un puissant inhibiteur du développement parasitaire. Il a une balance bénéfice/risque très favorable, un protocole de prise simple (traitement unidose ou traitement cours), est peu onéreux et échappe aux phénomènes de résistance. Il y a actuellement plus de 13 candidats médicaments en cours d'évaluation(52). La grande majorité d'entre eux a vocation à être utilisée dans le traitement des accès palustres simples. Les combinaisons artéfenomel – ferroquine et luméfantrine – KAF156 sont les candidats médicaments en tête de liste.

L'artéfenomel (ancien OZ439) est un trioxolane synthétique à demi-vie d'élimination longue (46-62h)(87). Bien toléré, il permet d'obtenir une clairance parasitaire rapide dans les infections à *Pf* et *Pv*. Sa proximité structurale avec les dérivés de l'artémisinine pourrait cependant l'exposer à un phénomène de résistance croisée. La ferroquine (SSR97193) est une 4-aminoquinoléine à demi-vie d'élimination très longue (16 jours). Elle reste active sur les souches résistantes à la chloroquine et à la pipéraquline *in vitro* mais cette efficacité est modérée lorsqu'elle est utilisée en monothérapie. La combinaison artéfenomel – ferroquine permet ainsi de potentialiser l'activité antiparasitaire des deux molécules tout en augmentant leur capacité d'échappement aux phénomènes de résistance, à l'instar des ACT.

Cette combinaison a été testée dans le cadre d'un essai clinique multicentrique de phase IIb pour le traitement curatif unidose du paludisme simple à *Pf* de l'adulte et de l'enfant(88). Les résultats de cette étude se sont avérés décevants : faible efficacité *in vivo* de toutes les combinaisons de doses testées, variabilité interindividuelle importante des taux moyens d'exposition à l'artéfenomel, clairance parasitaire deux fois plus lente chez les patients

asiatiques que chez les patients africains, problème de tolérance avec vomissements dans plus de 25% des cas post-administration de l'artéfenomel, etc. Cette étude a mis en évidence la nécessité de repenser le schéma posologique de cette combinaison (multidose au lieu d'unidose) et d'étudier en profondeur l'impact des mutations du gène Kelch13 sur l'efficacité de l'artéfenomel. Les cas asiatiques présentaient en effet des souches de *Pf* avec mutations conférant résistance du gène Kelch13 (ex : C580Y).

La combinaison luméfántrine – KAF156 (ganaplacide), développée par Novartis, est elle aussi en phase d'évaluation clinique (IIb, paludisme simple à *Pf*). La Malaria Research Unit (équipe SMITH, ICBMS UMR 5246) participe à cette étude dans le cadre du projet WANECAM 2 (West African Network for Clinical Trials of Antimalarial drugs 2)(89). L'originalité de cette combinaison repose sur la nouvelle molécule KAF156, puissant antipaludique et sur un nouveau mode de formulation de la luméfántrine (dispersion solide). Elle a vocation à être administrée une fois par jour pendant un à trois jours. Elle pourrait donc améliorer l'observance du traitement antipaludique en réduisant le nombre de prise journalière et/ou sa durée lorsque comparée à des traitements ACT classiques comme l'association artemether – luméfántrine. L'essai clinique a été clôturé durant l'été 2021 (NCT03167242, clinicaltrials.gov) et les résultats devraient être publiés dans les prochains mois(90).

D'autres nouvelles molécules intéressantes à citer sont la cipargamine, le DSM-265, MMV 390048 et la tafénoquine. La cipargamine (ancien KAE609) est une molécule de la famille des spiroindolones et un inhibiteur de la pompe Na<sup>+</sup>-ATPase de type 4 de *Pf*. Son mécanisme d'action original, son puissant et rapide effet parasiticide sur les schizontes sanguins de *Pf* et sa longue demi-vie d'élimination (19 – 26 h) font de cette molécule un des rares candidats médicaments potentiellement utilisables pour le traitement du paludisme grave. Elle permettrait aussi de bloquer la transmission de *Pf* au moustique en détruisant les gamétocytes sanguins(91,92). Une récente étude clinique a cependant mis en évidence la sélection d'une mutation conférant résistance à la cipargamine dans le gène *Pf*ATP-4 (G358S)(93). Elle a été détectée dans 22 des 34 cas d'échec thérapeutique de l'étude, chez des patients traités avec de fortes doses de cipargamine en monothérapie. L'administration de la cipargamine en association avec un autre antipaludique à mode d'action synergique pourrait permettre de limiter le risque de sélection de résistances. La DSM-265 et la MMV 390048 sont de nouvelles molécules qui pourraient potentiellement être utilisées en chimioprophylaxie(52,94). Enfin, la tafénoquine est une 8-aminoquinoléine active sur tous les stades de développement de *Pv*, y compris les hypnozoïtes. Il s'agit du premier nouveau traitement antipaludique validé par la Food and Drug Administration (FDA). Synthétisée pour la première fois en 1978 par Walter



Reed, son développement en tant que traitement antipaludique résulte d'un partenariat à but non lucratif entre GSK et le MMV. La tafénoquine est indiquée dans le traitement radical du paludisme à *Pv* et est commercialisée sous l'appellation Krintafel®. Le protocole qui inclut une unique dose de 300 mg permet d'améliorer l'observance du traitement radical tout en réduisant le risque d'émergence de résistances(95). Enfin, la recherche de nouveaux médicaments concerne aussi les traitements adjuvants, administrés lors de la prise en charge du paludisme sévère. La sévuparine est un analogue de l'héparine qui semble bloquer l'invasion érythrocytaire par les mérozoïtes ainsi que les phénomènes de cytoadhérence et de rosetting observés dans les infections à *Pf*. Des études pour évaluer l'effet de ce traitement adjuvant chez les patients atteints de paludisme sévère sont prévues(52).

### **Prise en charge des porteurs sains**

Un patient infecté par *Plasmodium spp* constitue un réservoir de parasites. Non diagnostiqués et non traités, les porteurs asymptomatiques permettent l'entretien du cycle parasitaire au sein des populations. La mise en place d'interventions pour identifier et traiter ces porteurs sains pourrait donc être une mesure de prévention complémentaire aux mesures déjà existantes en vue de rompre la chaîne de transmission du parasite. Il n'existe pour l'instant aucun protocole axé sur la prise en charge de ces patients qui pour rappelle, peuvent représenter jusqu'à 50% de la population en zone de forte transmission de *Plasmodium spp*(96).

## **B) Neuropaludisme**

### **1) Définition et épidémiologie du neuropaludisme**

Le neuropaludisme est la complication la plus mortelle du paludisme (97). Cette forme d'accès sévère est spécifique à *Pf*(98). L'OMS le définit comme un coma profond survenant au moins 1 heure après une crise convulsive ou la correction d'une hypoglycémie chez un patient avec parasitémie à *Pf* avérée et après exclusion de toutes les autres causes potentielles d'encéphalopathies(1,64). Il peut se développer à la suite d'un paludisme simple non ou mal traité ou survenir d'emblée. Le neuropaludisme survient essentiellement chez les enfants (< 5 ans) en Afrique subsaharienne qui représentent plus de 90% des décès.



## 2) Physiopathologie du neuropaludisme

La physiopathologie du neuropaludisme reste partiellement élucidée malgré les nombreuses études menées sur ce sujet. Plusieurs théories mécanistiques, probablement complémentaires, ont été proposées dont deux principales : (I) la séquestration des globules rouges parasités par *Pf* dans la microvasculature cérébrale et (II) la mise en place d'une réaction immunitaire systémique intense et délétère.

L'étude du cycle intra-érythrocytaire de *Pf* chez l'homme permet d'expliquer sa capacité à se séquestrer dans la microcirculation des organes profonds (poumons, cerveau...). Une fois le parasite à l'intérieur du globule rouge, il consomme progressivement son contenu pour son propre métabolisme. Cela aboutit à des modifications structurales de la cellule infectée : elle s'arrondit, perd sa déformabilité et développe des protubérances ("knobs") à la surface de sa membrane plasmique environ 12 à 15 h après son infection(1,99). Ces protubérances sont des structures antigéniques de nature protéique et de haut poids moléculaire appelées "*Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein-1" (*PfEMP-1*) qui sont codées par un ensemble de gènes *var*. L'expression finement régulée de ces gènes par phénomène de variation antigénique joue un rôle central dans la pathogénicité de *Pf*(19,100–102). En effet, la protéine *PfEMP-1* permet aux formes mûres des globules rouges parasités (pGR) de cytoadhérer aux cellules de l'endothélium vasculaire en interagissant avec certains de leurs récepteurs membranaires. C'est ce phénomène de cytoadhérence, propre à *Plasmodium falciparum*, qui est à l'origine de la séquestration des pGR dans la microcirculation des organes profonds (capillaires et veinules postcapillaires), entraînant leur disparition de la circulation sanguine périphérique. Dans le cerveau, les récepteurs membranaires impliqués dans ce phénomène incluent, entre-autres, ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1), VCAM-1 (vascular adhesion molecule-1), CD36 (cluster of differentiation 36) et EPCR (endothelial protein C receptor)(103–108).

Les pGR sphériques et rigides obstruent la lumière des microvaisseaux cérébraux. De plus, dans un contexte de paludisme sévère, les érythrocytes sains perdent aussi leur déformabilité et peuvent être captés les pGR séquestrés pour former des amas cellulaires appelés "rosettes". Les pGR peuvent aussi former des agglutinats cellulaires avec des thrombocytes circulants dans un processus appelé "clumping". Le rosetting, le clumping et la perte de déformabilité des érythrocytes aggravent le phénomène de séquestration. L'obstruction

des microvaisseaux réduit le flux sanguin (ischémie) entraînant, entre autres, une hypoxie au niveau du tissu cérébral mal irrigué et une souffrance de l'endothélium vasculaire.

Les interactions entre *PfEMP-1* et ces récepteurs cérébraux sont aussi à l'origine de l'activation d'un certain nombre de voies de signalisations intracellulaires. Cette activation induit des réarrangements structurels au niveau du cytosquelette des cellules endothéliales (ICAM-1) et de leurs jonctions serrées (VCAM-1) qui favorisent une augmentation de la perméabilité de la barrière hématoencéphalique (BHE)(109). La protéine *PfEMP-1*, en se liant à EPCR, empêche la conversion de la protéine C (ligand naturel de EPCR) en protéine C activée (PCa), favorisant ainsi l'activation des facteurs tissulaires VIII et V, la génération de thrombine et le dépôt local de fibrine (effet pro-coagulant délétère)(109).

Le mécanisme inflammatoire du neuropaludisme fait suite à l'activation du système immunitaire inné et à l'interaction entre la protéine *PfEMP-1* et son récepteur EPCR. Les pGR séquestrés finissent par éclater à la fin du cycle intra-érythrocytaire libérant localement mérozoïtes et déchets du métabolisme parasitaire (hémozoïne, microparticules etc.). Les récepteurs de l'immunité innée PPR (pathogen recognizing receptor) reconnaissent les motifs antigéniques du parasites PAMPs (pathogen associated molecular pattern) et les signaux de danger exprimés par les cellules de l'hôte, activant ainsi la réponse immunitaire innée. Se met alors en place une réponse inflammatoire intense auto-entretenu par le recrutement de cellules effectrices (cellules dendritiques, macrophages etc.) et leur production de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines. Elle est à l'origine d'une altération de l'endothélium vasculaire. Dans le cerveau, ce phénomène est amplifié par l'effet pro-inflammatoire de l'interaction *PfEMP-1/EPCR*, médié par l'activation des voies du Rho A et du NF- $\kappa$ B via le clivage de PAR1 (Protease Activated Receptor 1)(109–111).

D'autres théories mécanistiques du neuropaludisme ont été formulées. Certaines d'entre elles font intervenir l'oxyde nitrique (NO) dans la physiopathologie de la maladie mais les études ne s'accordent pas sur le rôle exact de cette molécule. En effet, certaines lui ont trouvé un rôle délétère pouvant expliquer certains symptômes du neuropaludisme (abolition transitoire de l'état de conscience, perturbation de la neurotransmission etc.) et d'autres, un effet plutôt protecteur(1,109). Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour approfondir nos

connaissances générales sur les mécanismes physiologiques impliqués dans le développement du neuropaludisme.

### 3) Manifestations cliniques et marqueurs de mauvais pronostic

Le tableau clinique du neuropaludisme varie en fonction de l'âge du patient.

#### Symptomatologie du neuropaludisme chez l'enfant

Les enfants de 6 mois à 5 ans vivant en Afrique subsaharienne constituent la population la plus touchée en matière d'incidence et de gravité de la maladie(1,112). Chez les enfants plus jeunes, les infections et les formes symptomatiques du paludisme sont rares du fait d'une immunité passive conférée par les anticorps de leur mère et de la présence d'hémoglobine fœtale, non propice au développement de *Plasmodium spp*(25,113,114). Les signes inauguraux du neuropaludisme sont aspécifiques et incluent fièvre, anorexie, toux et vomissements. Ils disparaissent assez rapidement (< 1 jours), mais peuvent durer plus longtemps (3 jours)(1,25). Les trois principaux symptômes chez l'enfant sont(25) :

- Le coma : il est généralement calme, accompagné d'une abolition du réflexe cornéen et est souvent précédé par une crise comitiale inaugurale. Il disparaît dans les 24 h chez le patient correctement pris en charge(1). Sa profondeur est un important facteur pronostic.
- Des signes de souffrance du tronc cérébral : fréquents, ils s'accompagnent des signes d'une hypertension intracrânienne et d'un œdème cérébral. Ils incluent, entre autres, la modification des réflexes pupillaires, l'abolition des réflexes cornéens et oculo-encéphaliques et la présence de schémas respiratoires anormaux (hyperventilation, respiration ataxique et périodique).
- Les convulsions : elles sont présentes chez 40 à 80% des enfants(115,116). Elles peuvent être généralisées, partielles ou subtiles (nyctagmus, hypersalivations, clonies des lèvres etc.), répétées ou prolongées dans le cadre d'un état de mal épileptique ou *status epilepticus* (64,115).

D'autres symptômes peuvent s'ajouter aux trois précédents (25):

- La rétinopathie palustre : elle se caractérise par un ensemble de lésions (blanchiment de la macula avec fovéa centrale épargnée, blanchiment de la rétine et de ses vaisseaux périphériques, hémorragies rétiniques multiples et œdème papillaire). Elle est présente

chez 60% des enfants atteints de neuropaludisme. On observe une rémission rétinienne complète en 1 à 4 semaines chez les patients qui survivent.

Dans les zones où la transmission de *Pf* est intense et où la parasitémie palustre est souvent positive, la définition de l'OMS du neuropaludisme peut manquer de spécificité. Le manque de ressources médicales complique l'élimination des autres étiologies possibles d'encéphalopathies ce qui peut conduire à des erreurs de diagnostic. Dans ces cas-là, la rétinopathie palustre qui est diagnosticable par simple examen du fond d'œil peut permettre de poser le diagnostic du neuropaludisme(117).

- Une hypoglycémie rebelle aux tentatives de correction est présente chez environ 1/3 des enfants au moment de leur admission hospitalière. Elle peut avoir plusieurs étiologies (diminution des réserves de glycogène, perturbation de la glycogénèse hépatique etc.)(118,119).
- Une acidose métabolique avec mécanisme de compensation respiratoire peut être observée. Elle est souvent associée à une hyperlactatémie.
- Une hyponatrémie d'origine non élucidée est retrouvée chez plus de 50% des patients(120,121).
- Un état de déshydratation peut altérer transitoirement la fonction rénale. L'évolution vers une insuffisance rénale aiguë est rare.
- Pourront aussi être retrouvés une hépatomégalie, une splénomégalie et plus rarement, un ictère (jaunisse).

Parmi toutes ces manifestations cliniques, certaines témoignent d'un mauvais pronostic :

- Une hypoglycémie présente dès l'admission du patient(1)
- Des infections bactériennes concomitantes (elles surviennent chez 5 à 8% des patients) et une leucocytose supérieure à 15000 cellules/ $\mu$ L(122).
- Les cas pédiatriques de neuropaludisme avec œdème papillaire ont un risque relatif de décès 4 à 5 fois supérieur à celui des cas qui ne présentent pas ce symptôme. C'est un marqueur de très mauvais pronostic. De même, la sévérité de l'atteinte rétinienne dans sa globalité est directement corrélée au risque de décès (123).
- La présence de convulsions (cliniques et/ou uniquement électrographiques) impactent négativement le pronostic de survie et celui du développement de séquelles à long terme (116,124).

- L'abolition des réflexes cornéens et/ou oculo-céphaliques est associée à un risque accru de décès(122).
- Un coma profond et prolongé est associé à un risque accru de décès et de développement de séquelles neurologiques(125).

### **Symptomatologie du neuropaludisme chez le patient adulte**

Chez l'adulte, le neuropaludisme fait partie d'un syndrome plus complexe impliquant la défaillance de nombreux organes(125). L'installation du coma se fait de manière progressive et sa profondeur est positivement corrélée au risque de décès(1,25).

Les patients présentent des signes cliniques de souffrance du tronc cérébral et des hémisphères cérébraux (trismus, rigidité de décortication et de décérébration, troubles de l'oculo-motricité, rigidité extrapyramidale). Les convulsions sont moins fréquentes que chez les enfants et surviennent dans 15 à 20% des cas(126). La rétinopathie palustre est bien moins caractérisée chez le patient adulte : l'œdème papillaire est rare et les hémorragies rétinienne s'observent dans 15 % des cas. Ces dernières sont associées à un risque accru de décès(127). La résolution du coma en cas de traitement adapté met plus de temps que chez l'enfant et se fait en 2 – 3 jours (112).

Parmi les défaillances d'organes qui peuvent venir compliquer un neuropaludisme chez l'adulte, sont retrouvés :

- La défaillance pulmonaire : elle se présente sous la forme d'un œdème ou d'un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA). La détresse respiratoire apparaît tardivement dans l'histoire naturelle de la maladie et les patients la présentant ont le plus mauvais pronostic de survie(128–130).
- L'insuffisance rénale aiguë et l'acidose métabolique sévère : elles s'accompagnent d'une dyspnée de Kussmaul(126,131). La présence d'une acidose métabolique à l'admission est corrélée à un risque augmenté de décès(1).
- Les surinfections bactériennes sont fréquentes et responsables de la majorité des décès tardifs(25)
- Hémoglobinurie, anémie, ictère, troubles hépatiques, choc hypovolémique et troubles de la coagulation (hypercoagulabilité avec thromboses veineuses et sous durales) peuvent aussi survenir(1,25).

#### 4) Mortalité et séquelles

En l'absence de traitement, le neuropaludisme mène irrémédiablement à la mort. S'il est diagnostiqué et traité promptement, son taux de létalité avoisine tout de même les 20% avec une majorité de décès survenant dans les 24 h après l'admission du patient. La mortalité est significativement augmentée en cas de grossesse(25).

En cas de guérison, 6 – 29% des enfants et 3 – 10% des adultes développent des séquelles neurologiques(98,132–134). Chez l'enfant, ces séquelles peuvent être transitoires (ataxies) ou partiellement résolutive en plusieurs mois ou plusieurs années (hémiparésies) (1,25). Elles apparaissent d'emblée ou après un certain délai de latence : les épilepsies, par exemple, peuvent apparaître des semaines voire des mois après la guérison(64). Les séquelles peuvent être classées en trois principales catégories : cognitives et comportementales (troubles de l'attention, de la mémoire, du comportement), motrices (spasticité, ataxie, cécité corticale, langage) et épileptiques(1). Elles retentissent négativement sur la vie de ces jeunes enfants et sont à l'origine de difficultés d'apprentissage, absentéisme et échec scolaire, de rejet par les pairs etc. Certains de ces enfants décèdent dans les mois suivant leur sortie d'hôpital du fait du manque de prise en charge adaptée(1,135).

Les séquelles neurologiques sont moins bien documentées chez l'adulte. Elles incluent psychoses, troubles du comportement, lésions des nerfs crâniens, syndromes extrapyramidaux, neuropathies ou encore épilepsies focales(25,126,136).

### C) La voie nasale pour l'administration du traitement de pré-transfert du paludisme

#### 1) Le traitement de pré-transfert intra-rectal du paludisme

Ce traitement de pré-transfert correspond à l'administration IR d'une dose d'artésunate (suppositoire, 10 mg/kg) avant transport du patient dans une unité de soins où il pourra recevoir un traitement antipaludique par voie IV. Il est indiqué (i) chez les enfants (< 6 ans) présentant des symptômes évocateurs du paludisme grave, (ii) lorsque la voie orale est inutilisable (altération de l'état de conscience, vomissements) et (iii) lorsque le traitement antipaludique par voie parentérale ne peut être initié avant plusieurs heures(7,137–139). Le suppositoire est alors administré par un membre de la communauté, parents, voisins ou référent de santé. Dans ces conditions, le traitement de pré-transfert IR permettrait d'obtenir une réduction substantielle (jusqu'à 50%) des décès et des séquelles neurologiques irréversibles. La condition (iii)

s'explique par le délai d'action de l'artésunate IR. Quatre à 12 h sont nécessaires pour réduire la parasitémie de moitié. Le bénéfice basé sur l'amélioration de la survie et la réduction des séquelles n'est donc significatif qu'en cas de retard important de la prise en charge IV(7,140).

Le traitement de pré-transfert n'a pas de visée curative. Son schéma posologique (une dose, monothérapie) et la biodisponibilité variable de l'artésunate IR nécessitent l'adressage rapide du patient dans une unité de soins et l'instauration du traitement de consolidation IV(138,141). Sans ces derniers, la reviviscence du parasite est certaine et avec elle l'augmentation des risques de décès, de survenue de complications et de sélection de résistances à l'artésunate. Enfin, le transfert dans un centre de santé est aussi rendu nécessaire par la symptomatologie aspécifique du paludisme. Un patient suspecté atteint de paludisme peut en réalité souffrir d'une autre pathologie infectieuse. La prise en charge hospitalière permet de réduire le risque de décès et de complications qui résultent d'un diagnostic erroné par la mise en place rapide du traitement adéquat(7,142). Le taux de transfert hospitalier après administration d'artésunate IR varie selon les études (ex : 20% – 96%)(140,143). La présence de symptômes appréciés comme « graves » (ex : neuropaludisme), l'absence de coûts additionnels de prise en charge et une bonne compréhension du rationnel du traitement de pré-transfert sont des facteurs qui favoriseraient l'adhésion des parents au transfert hospitalier(142,144). Le dernier facteur illustre la nécessité de former parents et référents de santé sur la nature de ce traitement. De précédentes études ont en effet démontré qu'il est parfois perçu comme une alternative aux ACT et donc suffisant pour traiter les patients(145).

Le déploiement à grande échelle du traitement de pré-transfert IR est encouragé et monitoré par CARAMAL (Community Access to Rectal Artesunate for Malaria), consortium créé par UNITAID et soutenu par le MMV et l'OMS. Il a pour autres missions :

- D'évaluer comment l'introduction de l'artésunate IR au sein des communautés participe à la réduction du taux de létalité du paludisme (via les plateformes de gestion communautaire des maladies infectieuses)
- Et de compiler les retours d'expériences de pays Africains qui ont introduit l'artésunate IR dans leurs directives de prise en charge d'urgence du paludisme

Le rapport de CARAMAL, publié en décembre 2018, fait état d'un déploiement très limité de ce traitement, notamment en Afrique subsaharienne(146). Ce constat est dû à plusieurs facteurs. Par exemple, seulement 48% des pays Africains incluent l'administration IR d'artésunate dans leurs directives nationales de prise en charge du paludisme sévère, la moitié de ces derniers



avec des recommandations obsolètes (Figure 4). Les remontés d'informations concernant l'utilisation de l'artésunate IR sont de plus limitées, probablement du fait du manque de référents de santé et de plateformes agréées pour la gestion communautaire des maladies infectieuses.

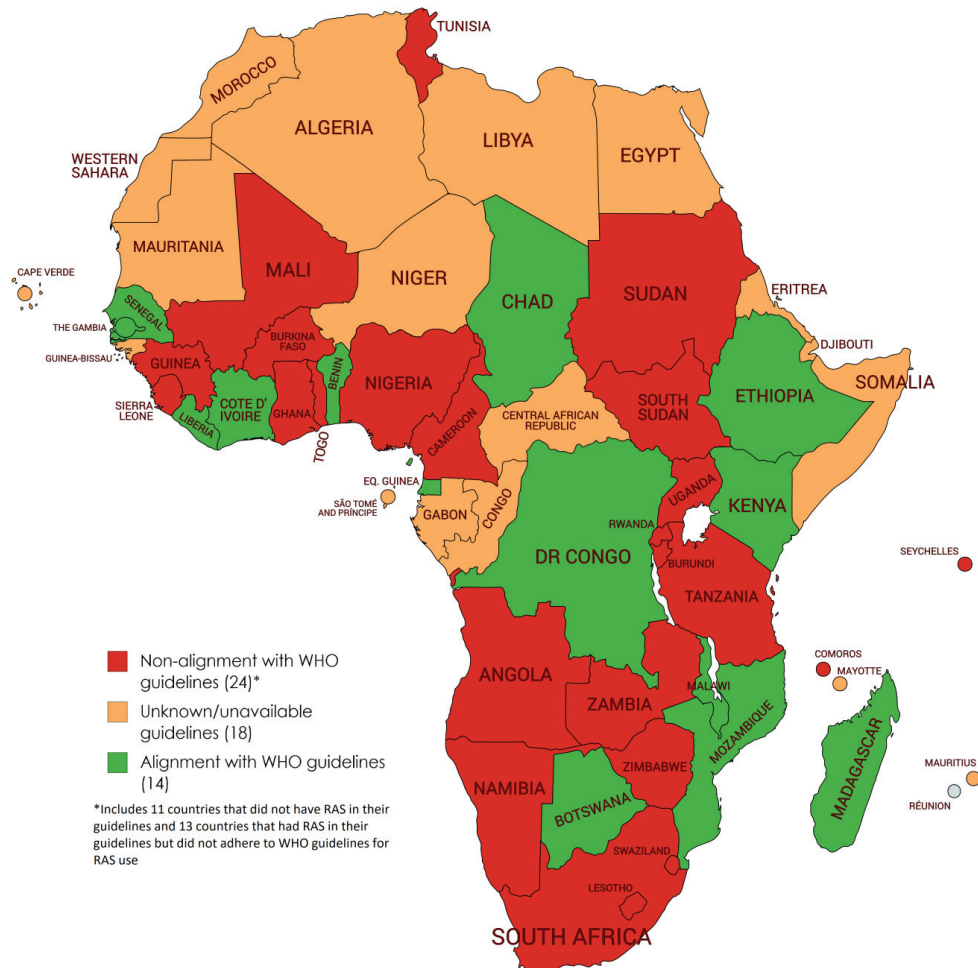


Figure 4. Pays ayant approuvés l'administration intra-rectale d'artésunate dans leurs directives nationales de traitement (modifiée) (146)

L'accès à des suppositoires de qualité certifiée n'est possible que depuis 2018 avec l'obtention par CIPLA Ltd et Strides Pharma Sciences Ltd de la préqualification OMS de leur produit respectif. En 2018, ces suppositoires avaient obtenu des autorisations de mise sur le marché au Bénin, République Démocratique du Congo (RDC), République du Congo (RC) et Sénégal pour CIPLA Ltd et au Tchad, Gabon, RDC et RC pour Strides Ltd. Le mode de conservation de ces suppositoires est crucial : ils ne doivent ni être réfrigérés, ni congelés, ni stockés à des températures supérieures à 25°C. En zone d'endémie où le climat est généralement tropical, cette température maximale de stockage est rapidement atteinte et menace l'intégrité du suppositoire et sa teneur en principe actif(9). Selon le rapport de CARAMAL, de nombreux



signalements de fonte de suppositoires ont déjà été enregistrés.

D'une manière plus générale, l'administration IR d'artésunate peut aussi être limitée par les risques d'expulsion des suppositoires, notamment chez les jeunes enfants qui n'ont pas encore le contrôle de leur sphincter anal (selon l'âge d'apprentissage de la propreté)(10). Les expulsions précoces réduisent considérablement l'absorption intestinale et la biodisponibilité finale de l'artésunate. Cette réduction d'absorption peut être majorée chez les très jeunes enfants, chez qui la résorption intestinale après traitement IR est sujette à variabilité interindividuelle(10). Des cas d'usage détourné des suppositoires d'artésunate ont aussi été signalés, notamment pour traiter des cas de paludisme simple en monothérapie. Ils exposent à des risques de sélection de résistances, et compromettent l'intégration du traitement de pré-transfert dans les directives nationales pour la prise en charge du paludisme sévère(146,147).

Un dernier critère qui pourrait influencer l'adhésion des populations à l'administration IR du traitement de pré-transfert est une perception culturelle négative de cette voie. Une étude réalisée en 2010 mettait en évidence une faible utilisation générale de la voie rectale au Laos, perçue comme moins efficace que d'autres (ex : orale et IM) et responsable de plus d'effets iatrogènes(148). D'autres études réalisées dans différents pays d'Afrique ont conclu à un taux élevé d'adhésion au traitement rectal, qui pourrait être accentué par une meilleure information des parents sur le balance bénéfice/risque de l'utilisation de cette voie (en Zambie, Guinée Bissau, Ouganda, au Malawi, etc.)(147).

## 2) Pourquoi la voie nasale ?

La voie nasale (IN) est décrite comme une bonne alternative aux voie IV et orale pour l'administration de médicaments. Pour le patient, elle permet une administration facile, autonome, rapide et non invasive des médicaments(149). Un traitement de pré-transfert formulé pour cette voie serait donc simple à utiliser au sein des communautés et son utilisation ne nécessiterait aucune compétence technique. Elle permet aussi un double ciblage thérapeutique : en fonction de la zone anatomique d'administration, les principes actifs (PA) peuvent être absorbés directement dans la circulation systémique et/ou dans le système nerveux central (SNC) via les neurones olfactifs et le bulbe olfactif. Ce dernier mode d'absorption est particulièrement intéressant dans un contexte de prévention du neuropaludisme. Le bulbe olfactif serait en effet directement impliqué dans la physiopathologie du neuropaludisme. Il faciliterait l'accès des pGR au cerveau en leur servant de porte d'entrée lors de la phase précoce de la maladie(150). L'administration IN précoce d'un traitement de pré-transfert permettrait

donc de traiter les symptômes généraux du paludisme (par diffusion systémique du médicament) tout en prévenant l'invasion du SNC par le parasite. La voie nasale est déjà utilisée pour l'administration de nombreuses classes médicamenteuses comme les dérivés morphiniques (fentanyl), les antimigraineux ou triptans (sumatriptan, zolmitriptan), ou encore des anti-inflammatoires (ketorolac)(151–153).

### 3) Description anatomique et histologique de la cavité nasale

Le nez est un organe multifonction. Il permet le conditionnement de l'air inhalé en éliminant les particules qui s'y trouvent, en l'humidifiant et en le réchauffant pour ajuster sa température à celle du corps(154). C'est aussi l'organe de l'olfaction : les neurones olfactifs présents dans la muqueuse nasale captent les signaux olfactifs et les transmettent au cerveau pour traitement(155).

#### *L'architecture de la cavité nasale*

La cavité nasale se compose d'une charpente ostéo-cartilagineuse. Elle se subdivise en deux fosses nasales séparées l'une de l'autre par une cloison (septum). Chaque fosse nasale présente quatre parois. La paroi supérieure (ou voûte) résulte de l'association entre un segment fronto-nasal (formé par l'os propre du nez et l'épine nasale de l'os frontal), un segment ethmoïdal (formé par la lame criblée de l'ethmoïde) et un segment sphénoïdal (formé par le corps du sphénoïde). La paroi inférieure (ou plancher), est formée dans ses deux tiers antérieurs par l'apophyse palatine du maxillaire supérieur et dans son tiers postérieur par la lame horizontale de l'os palatin. Elle sépare la cavité nasale de la cavité buccale. La paroi médiale est le septum nasal. Elle s'étend d'avant en arrière de l'ouverture antérieure des fosses nasales (narines) à leur ouverture postérieure sur le nasopharynx (choanes). Enfin, la quatrième et dernière paroi, la paroi latérale, est formée par plusieurs segments osseux : la base du maxillaire supérieur, l'os lacrymal, la lame verticale du palatin, l'aile interne de l'apophyse ptérygoïde du sphénoïde et la masse latérale de l'ethmoïde. Dans sa partie moyenne, appelée aussi « région turbinaire », sont retrouvés les cornets inférieur, moyen et supérieur (de bas en haut). Ce sont de minces lames osseuses enroulées sur elles-mêmes. Les cornets moyen et supérieur appartiennent à l'os ethmoïdal. Le cornet inférieur qui est le plus long d'entre eux, est indépendant. La surface globale de la cavité nasale est estimée à 150 – 160 cm<sup>2</sup> pour un volume total de 15 à 20 ml chez l'adulte (156,157)

### *Muqueuses nasales respiratoire et olfactive*

Les reliefs ostéo-cartilagineux de la cavité nasale sont tapissés par des muqueuses d'histologies et de fonctions différentes.

La partie vestibulaire, située juste après les narines, s'étend sur une surface de 0,6 cm<sup>2</sup>. Elle est recouverte par une muqueuse avec un épithélium stratifié squameux (158). Ce dernier présente des poils très épais sans muscles arrecteurs associés, appelés « vibrisses », qui débarrassent l'air inhalé des grosses particules. Le rôle de cet épithélium dans l'absorption générale de PA étant négligeable, il ne sera pas discuté dans cet exposé(159). Des glandes séreuses situées à la jonction entre le vestibule et la région turbinale sécrètent du mucus.

La zone respiratoire, qui fait suite au vestibule, comprend le plancher de la cavité nasale ainsi que les cornets inférieur et moyen. Elle est recouverte par une muqueuse de type respiratoire dont la fonction est l'humidification et la protection des voies aériennes. L'épithélium est pseudostratifié (toutes les cellules sont au contact de la membrane basale) et se compose de cellules cylindriques ciliées et non ciliées, de cellules caliciformes productrices de mucus ainsi que de cellules basales, précurseurs des différents types cellulaires précédemment cités. La présence de microvillosités au pôle apical des cellules cylindriques augmente la surface de contact de l'épithélium respiratoire qui s'étend sur une surface moyenne de 130 – 150 cm<sup>2</sup>(158,160). Les cellules ciliées représentent 70 à 80% des cellules superficielles de l'épithélium (161). Leurs cils vibratiles sont animés d'un mouvement de battement antéropostérieur (15 – 20 Hz). Ces derniers et le mucus qui tapisse l'épithélium constituent l'appareil mucociliaire qui a pour fonction de piéger particules et substances exogènes et de les éliminer dans le nasopharynx(162). Le chorion sous-jacent est composé de tissu conjonctif, de glandes sous-muqueuses sécrétrices de mucus, d'un réseau extrêmement riche de vaisseaux sanguins, d'un système de drainage lymphatique et de filets d'innervation sensitive tributaires de la branche maxillaire du nerf trijumeau(158,162). La grande surface relative de la zone respiratoire ainsi que la richesse de sa vascularisation font d'elle la zone de prédilection pour l'absorption dans la circulation systémique des principes actifs administrés par voie nasale(159).

Enfin, la zone olfactive, qui englobe la voûte nasale et le cornet supérieur, est recouverte par une muqueuse de type olfactive impliquée dans la perception des odeurs(159). L'épithélium olfactif ou neuroépithélium, de nature prismatique pseudostratifiée, est constitué de trois types de cellules : neurones olfactifs, cellules de soutien (ex : cellules sus-tentaculaires) et cellules basales(157). Les neurones olfactifs sont fusiformes, bipolaires et leurs corps cellulaires sont

retrouvés dans la couche épithéliale(158). Ils se projettent via leur premier type de prolongement (dendrites se terminant par des cils) jusque dans la couche superficielle du mucus nasal. Les récepteurs sensoriels présents sur ces cils sont responsables de la captation des signaux olfactifs. Leur deuxième type de prolongement (axones) sont présents dans le chorion et s'organisent en filets nerveux amyéliniques. Ils sont groupés par paquets, dans des invaginations membranaires de cellules similaires aux cellules de Schwann (dites Schwann-Like). Ces cellules enveloppantes délimitent, autour des filets nerveux, des chambres remplies de fluide neurale(158). Les filets nerveux traversent le chorion de la muqueuse, la lame criblée de l'éthmoïde, l'espace sous-arachnoïdien et rejoignent le bulbe olfactif où les terminaisons nerveuses font synapses avec des cellules mitrales(157,158). Les neurones olfactifs se renouvellent toutes les 3 à 4 semaines du fait de leur contact constant avec le milieu extérieur et ses toxines (157). Bien que recouvert de mucus, l'épithélium olfactif en lui-même est dépourvu de cils vibratiles. La clairance mucociliaire est assurée par la présence d'îlots de muqueuse respiratoire au sein de la zone olfactive (157). En dessous de l'épithélium olfactif, le chorion contient des terminaisons nerveuses sensibles du nerf nasal interne (branche ophtalmique et maxillaire du nerf trijumeau), de nombreux vaisseaux sanguins et lymphatiques, du tissu conjonctif ainsi que des glandes exocrines sécrétrices de mucus (glandes de Bowman) (158,159). La zone olfactive s'étend sur environ 5% de la surface nasale chez l'homme (~10 cm<sup>2</sup>). Par comparaison, elle peut représenter jusqu'à 50% de cette surface chez les rongeurs(158,163). La zone olfactive est la zone préférentielle pour l'administration de PA destinés à être absorbés directement dans le cerveau grâce à sa richesse en structures nerveuses et sa proximité avec le SNC (via le bulbe olfactif)(157,159).

#### 4) Devenir d'un principe actif administré par voie nasale

Un principe actif administré par voie IN peut se déposer directement sur sa zone cible ou y être acheminé par l'appareil mucociliaire grâce aux battements des cils motiles. S'il a vocation à traiter une affection locale, le PA n'est pas absorbé et demeure au niveau de l'épithélium. Pour le traitement d'une affection systémique, le PA traverse l'épithélium jusqu'au chorion, essentiellement au niveau de la muqueuse respiratoire. Il traverse ensuite la barrière endothéliale et pénètre dans la circulation systémique pour rejoindre son site d'action, à distance de l'épithélium nasal. (164).

Le PA administré par voie IN peut aussi avoir pour but de traiter une affection du SNC. Nous nous concentrerons dans la suite de cette partie sur le traitement de pathologies cérébrales.

La voie IN est intéressante dans ce contexte car elle permet la délivrance de molécules thérapeutiques dans le cerveau dans le cadre d'un processus appelé « nose to brain delivery » (NtB)(165–168). La NtB peut être directe (de la muqueuse nasale au cerveau) ou indirecte (inclut le passage de la molécule dans la circulation systémique dans un premier temps, suivi de son transport à travers la BHE dans un deuxième temps). Les différentes voies et mécanismes impliqués dans la NtB ne sont pas encore totalement élucidés mais plusieurs théories ont déjà été formulées(155).

Il y a deux voies directes de NtB, aussi appelées « voies neuronales » : la voie médiée par les neurones olfactifs (ou voie des neurones olfactifs) et la voie médiée par le nerf trijumeau (ou voie du nerf trijumeau). Elles constituent les deux principaux mécanismes du processus NtB(158,168).

### *Voie des neurones olfactifs*

Elle est caractérisée par une implication directe des neurones olfactifs. Le principe actif peut, d'une part, rejoindre le cerveau par transport intracellulaire. Il est absorbé par endocytose ou pinocytose au niveau des terminaisons nerveuses qui projettent dans la cavité nasale et rejoint le bulbe olfactif par transport axonal(155). Libéré dans la fente synaptique, il peut être pris en charge par les cellules post-synaptiques qui projettent dans différentes zones du cerveau (hypothalamus, amygdale, tubercule olfactif etc.) ou se mélanger au liquide cérébral interstitiel via lequel il pourra diffuser dans le parenchyme cérébral par transport périvasculaire(168). Le transport périvasculaire est un mécanisme de diffusion de molécules neurales et de substances endogènes dans le cerveau. Il a lieu au sein d'espaces périvasculaires, des cavités souvent virtuelles délimitées par la paroi des vaisseaux sanguins cérébraux et la membrane basale du tissu environnant(160). Les mouvements des molécules au sein de ces espaces périvasculaires résultent de l'association entre le phénomène du « Bulk Flow » (convection extracellulaire) et les pulsations artérielles : on parle de « pompe périvasculaire »(158). La NtB par l'intermédiaire de la voie des neurones olfactifs peut, d'autre part, se faire selon un processus dit extracellulaire. Le PA traverse l'épithélium olfactif par transport paracellulaire et/ou transcellulaire (cellules de soutien) jusqu'au chorion(169). Il rejoint ensuite le bulbe olfactif grâce au bulk flow, en se déplaçant le long des axones des neurones olfactifs, à l'intérieur de l'espace péri-neurale délimité par les cellules enveloppantes Schwann-Like(155,158). L'alternance des stades de polarisation et de dépolarisation des neurones olfactifs pourrait promouvoir le déplacement de PA le long de leurs axones(155).

### **Voie du nerf trijumeau**

La voie du nerf trijumeau concerne à la fois la muqueuse olfactive et la muqueuse respiratoire. En effet et comme précédemment décrit, les deux types de muqueuse sont innervées par des filets nerveux sensitifs qui dérivent du nerf trijumeau. Ce dernier permet ainsi de relier les muqueuses respiratoire et olfactive au SNC par son origine centrale localisée au niveau des noyaux gris du pont de Varole (tronc cérébral)(158,162). Le tronc cérébral est donc un point d'entrée dans l'encéphale pour les molécules thérapeutiques qui empruntent la voie du nerf trijumeau. Cet acheminement cérébral peut là aussi résulter de processus intracellulaires et/ou extracellulaires selon des séquences d'évènements semblables à celles précédemment décrites pour la voie des neurones olfactifs(158).

### **Mécanisme préférentiel de NtB**

Le transport intracellulaire de PA par voie neuronale est un processus lent qui peut nécessiter des heures, voire plusieurs jours(155). Plusieurs équipes scientifiques ont cependant réussi à mettre en évidence la présence de PA dans le cerveau quelques minutes seulement après leur administration par voie IN. Le transport par voie intracellulaire n'est donc vraisemblablement pas le mécanisme primaire impliqué dans la NtB par voie neuronale. Le transport par voie extracellulaire serait alors responsable du transfert rapide dans le cerveau des molécules thérapeutiques administrées au niveau des muqueuses olfactive et respiratoire(155,170,171).

### **Autres mécanismes possibles de NtB**

En dehors des voies de délivrances neuronales, il existe d'autres voies potentielles d'accès au cerveau pour les PA administrés en IN. Ces voies sont indirectes et incluent notamment :

- La voie systémique : Le PA passe de la muqueuse respiratoire et/ou olfactive à la circulation systémique via les vaisseaux du chorion et rejoint le cerveau en traversant la BHE s'il en est capable. Il est donc soumis à une éventuelle clairance rénale, à un métabolisme par des enzymes circulantes et doit surmonter les systèmes barrières de la BHE (jonctions serrées, pompes à efflux)(168,169).
- La voie lymphatique : Le PA peut théoriquement passer dans la circulation lymphatique nasale et rejoindre ensuite celle du cerveau(155).

Une molécule administrée par voie IN peut ainsi être délivrée dans le SNC pour y réaliser son action thérapeutique. Son absorption résulte probablement d'une combinaison des mécanismes de transport précédemment décrits. La biodisponibilité de la molécule sera fonction de plusieurs paramètres incluant son adaptation aux contraintes de la voie IN, ses propres propriétés physicochimiques ou encore la nature de son dispositif d'administration.

#### 5) Facteurs qui peuvent influencer la biodisponibilité du principe actif

##### **Volume et surface de contact de la cavité nasale**

Le volume de la cavité nasale est l'une des principales contraintes de la voie IN (15 – 20 ml chez l'homme adulte)(149,156). Il limite grandement la quantité de formulation administrable: seulement 150 – 200 µl par narine pour les formulations liquides et 20 – 50 mg pour les poudres (172). L'administration de quantités supérieures aboutit à leur élimination par déglutition (pour les liquides) et/ou à des irritations locales (pour les poudres)(149). La voie IN est ainsi beaucoup plus adaptée pour les PA très actifs, capables de générer l'effet thérapeutique recherché à faibles concentrations. Elle est aussi plus favorable aux PA très solubles en solution. Le faible volume administrable est alors moins limitant car il est possible d'administrer une grande quantité de PA dans un petit volume de formulation(173).

Parallèlement à son volume restreint, la cavité nasale présente aussi une surface de contact limitée. Elle s'en retrouve encore plus réduite quand il est nécessaire de cibler spécifiquement l'un des deux types de muqueuse (respiratoire ou olfactive) pour obtenir l'effet thérapeutique recherché tout en limitant le risque iatrogène. La question du ciblage impose aussi de réfléchir à l'accessibilité des deux types de muqueuse. La zone olfactive est située dans la partie postérieure de la cavité nasale, au niveau de la voûte nasale et est donc difficile d'accès. Son ciblage à l'aide d'un dispositif d'administration non adapté peut non seulement entraîner le dépôt du PA dans une zone non désirée, mais aussi générer des lésions traumatiques potentiellement sévères (perforation de la lame criblée de l'ethmoïde). Il est donc nécessaire de considérer l'architecture nasale dans sa globalité lors du développement d'un nouveau médicament qui a vocation à y être administré. Coupler le développement du dit médicament à celui de son dispositif d'administration est nécessaire afin de pouvoir délivrer les bonnes doses au(x) bon(s) endroit(s) tout en respectant la physiologie et l'anatomie du nez.



### **Fonction barrière de la muqueuse nasale**

La muqueuse nasale est en contact direct avec le milieu extérieur et ses toxiques. Elle dispose donc d'un véritable arsenal de défense qui lui permet de se prémunir des agressions extérieures en éliminant les potentiels toxiques.

Les particules exogènes ont une durée de résidence limitée dans la cavité nasale. Elles sont tout d'abord piégées dans le mucus puis éliminées dans le nasopharynx en même temps que ce dernier par les battements des cils vibratiles. Ces particules sont ensuite détruites dans le tube digestif(174). Ce processus d'élimination est appelé clairance mucociliaire (CMC). La CMC peut réduire le temps de résidence d'un PA dans la cavité nasale, son absorption et *in fine*, sa biodisponibilité systémique et/ou cérébrale. Le temps de résidence d'un PA dans la cavité nasale est estimé à seulement 15 – 30 minutes(149,156,174). L'efficacité de la CMC dépend de facteurs comme la quantité et la viscosité du mucus, la densité des cils vibratiles et la fréquence de leurs battements ainsi que de la zone de déposition des substances. Tout élément susceptible de modifier ces facteurs peut modifier le temps de résidence des PA. La température, par exemple, diminue la CMC par un mécanisme encore inconnu. La cigarette augmente la production du mucus mais diminue la densité ciliaire. De nombreux procédés galéniques existent pour lutter contre la CMC, ils seront discutés dans une autre partie de ce manuscrit(149). L'élimination des PA peut aussi être facilitée par la présence de pompes à efflux comme la Glycoprotéine-P (P-gp) et d'un métabolisme enzymatique au niveau de la muqueuse nasale. Ce dernier est particulièrement riche. Il implique notamment des carboxyl-estérases, glutathion S-transférases, des isoenzymes du cytochrome P450 et des enzymes protéolytiques. Un large panel de PA peut donc être dégradé après administration et voir sa biodisponibilité systémique et cérébrale réduite(149,174).

### **Paramètres physicochimiques du principe actif**

Le premier paramètre à considérer est la stabilité du PA, dans sa formulation véhicule et au niveau de la muqueuse nasale. Toute dégradation physique, chimique ou enzymatique réduit la fraction absorbée et donc la biodisponibilité finale de la molécule(149,173).

Pour être absorbée, le PA passe ensuite par deux étapes successives. Il doit d'abord se dissoudre (poudre) dans le mucus ou s'y mélanger (solution), le traverser et rejoindre l'épithélium sous-jacent. Le mucus nasal, de nature aqueuse, joue alors le rôle de solvant de dissolution. Plus le PA d'intérêt est lipophile et plus il aura du mal à s'y dissoudre et à le traverser. Il restera donc piégé dans le mucus et sera éliminé par la CMC(173,174).



Une fois le mucus traversé, le PA doit ensuite franchir l'épithélium et rejoindre la circulation sanguine via les vaisseaux sanguins présents dans le chorion et/ou rejoindre le SNC par les mécanismes de la NtB. D'une manière générale, le transport au travers des barrières biologiques est plus favorable aux molécules lipophiles et aux petites molécules hydrophiles (< 300 Da). Les PA lipophiles de masses moléculaires (MM) inférieures à 1 kDa sont rapidement et efficacement absorbés par transport transcellulaire. Au-delà, leur absorption est significativement réduite(149,175). Quant aux PA hydrophiles, ils traversent l'épithélium essentiellement par passage paracellulaire via les jonctions serrées intercellulaires. Leur absorption est donc dépendante de leur MM et de la perméabilité de ces jonctions serrées. Plus la MM de la molécule hydrophile est importante, moins elle diffusera par voie paracellulaire(149,173,174). Dans la littérature, l'épithélium nasal est cependant qualifié de « leaky epithelium », littéralement, « épithélium coulant ». Il est caractérisé par des valeurs de résistance électrique transépithéliale (TEER, mesure la fonction barrière du tissu) plus faibles que celles mesurées sur les épithéliums cornéen et digestif(176,177). Ces valeurs, mesurées sur muqueuse nasale humaine excisée ont été estimées à 75 – 180  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ (176). L'épithélium nasal semble ainsi plus favorable au passage de molécules thérapeutiques. Des études ont en effet démontré la présence de molécules de haut poids moléculaire dans le sang et cerveau quelques minutes seulement après leur administration IN(158,162). La perméabilité accrue de l'épithélium olfactif s'explique au moins en partie par le turnover rapide des neurones olfactifs. Les protéines constitutives des jonctions serrées peuvent ne pas être totalement fonctionnelles lors du processus de maturation de ces neurones, aboutissant à des espaces intercellulaires dépourvus de jonctions serrées matures. Ces dernières seraient alors plus perméables aux différentes molécules présentes à la surface de l'épithélium (155,157).

Enfin, la perméabilité membranaire d'un PA dépend aussi de son état d'ionisation. La fraction non ionisée (ou moléculaire) d'un PA est mieux absorbée que la forme ionisée. Dans cet état, le coefficient de partage (Log P) est le plus élevé et avec lui, la lipophilie de la molécule. L'état d'ionisation d'une molécule dépend de son pKa et du pH environnant (5,5 – 6,5 pour la muqueuse nasale). Ce dernier peut donc modifier l'absorption d'un PA en modifiant son état d'ionisation(149).

## 6) La formulation galénique : réponse aux contraintes de la voie nasale

L'amélioration de la biodisponibilité d'un PA passe par le développement d'une formulation adaptée au site d'administration. Il existe de nombreuses stratégies galéniques pour résoudre les limitations inhérentes à la voie IN et au PA. Certaines d'entre elles sont discutées ci-dessous.

### **Amélioration de la solubilité aqueuse et de la stabilité du PA**

L'augmentation de la solubilité d'un PA dans son véhicule permet d'y augmenter sa concentration et de réduire le volume de forme galénique administrée. La solubilité aqueuse peut être améliorée en administrant des prodrogues plus hydrophiles du PA, en utilisant des co-solvants (éthanol, polyéthylène glycol, glycérol) où en encapsulant l'actif (ex : cyclodextrines)(149). Les cyclodextrines sont des oligosaccharides qui disposent d'une cavité centrale apolaire (où est complexé l'actif peu hydrosoluble) et d'une surface externe riche en groupements hydroxyles qui leur confèrent une bonne solubilité aqueuse(178). L'utilisation de prodrogues et d'excipients d'encapsulation protègent aussi le PA des dégradations chimiques et enzymatiques(149,179). Enfin, l'amélioration de la stabilité des PA peut aussi passer par l'administration d'inhibiteurs enzymatiques avant l'administration de la formulation galénique(149,180).

### **Réduction de la clairance mucociliaire**

La plupart des formulations IN actuellement testées sont liquides (solution, suspension) et facilement éliminables par CMC et écoulement hors des fosses nasales(149,161). Il est possible de s'opposer à cette élimination en augmentant leur viscosité, par exemple, à la suite d'une transition de phase *in situ*. C'est le cas notamment des gels thermoréversibles. Initialement liquides, ils se gélifient *in situ* lorsqu'est atteinte une température seuil appelée température de transition(181,182). La gélification est obtenue grâce à des polymères thermoréversibles, capables de s'autoassembler pour former un réseau polymérique étroit lorsque la température seuil est atteinte (ex : poloxamers). Il est possible de moduler la densité du réseau et la viscosité du gel *in situ* en modulant la concentration des polymères. L'augmentation de la viscosité des formulations permet aussi d'obtenir une libération prolongée et/ou retardée du PA et donc d'augmenter sa fenêtre thérapeutique(181). Une trop grande viscosité peut cependant réduire la diffusion de l'actif hors de la forme galénique et réduire son absorption(183). La réduction de la CMC peut aussi être obtenue en utilisant des polymères

mucoadhésifs (chitosan, alginates, cellulose et dérivés). Ils interagissent avec les mucines du mucus et permettent de fixer la formulation dans la cavité nasale. Cette fixation promeut la diffusion de l'actif en augmentant localement son gradient de concentration. Les excipients mucoadhésifs peuvent aussi être utilisés dans des formulations solides (ex : poudres)(149).

### **Amélioration de l'absorption des PA**

Elle peut être obtenue à l'aide de promoteurs réversibles d'absorption (ex : chitosan, cyclodextrines, sels biliaires, surfactants). Ils agissent en ouvrant transitoirement les jonctions serrées intercellulaires pour favoriser la diffusion paracellulaire des PA et/ou en augmentant la fluidité membranaire des cellules(149,155,183). Des études ont aussi été démontrées que certaines formulations comme les nanoparticules, les liposomes et les nano et microémulsions améliorent la délivrance des PA au niveau du SNC par NtB(155). Une meilleure absorption peut être obtenue en augmentation la fraction non ionisée des PA par modulation du pH de la formulation. Ce pH ne doit cependant pas altérer celui de la muqueuse nasale au risque de créer des irritations et de promouvoir le développement de microorganismes (ex : bactéries)(149).

### **Ciblage de l'administration nasale**

Le ciblage de la zone d'administration est crucial dans le développement d'une formulation pour voie IN car il détermine la zone d'absorption du PA. De même, il limite les risques iatrogènes qui peuvent résulter d'un dépôt aléatoire de l'actif. Le ciblage passe par l'utilisation d'un dispositif d'administration adapté à l'architecture nasale. Il doit permettre de contrôler la taille des gouttelettes administrées pour les formulations liquides. Les particules de tailles comprises entre 5 – 7  $\mu\text{m}$  sont retenues dans la cavité nasale. Les particules de tailles inférieures à 5  $\mu\text{m}$  se déposeront plus profondément dans l'arbre bronchique(174).

### **Et l'artésunate dans tout ça ?**

L'artésunate est une lactone sesquiterpénique, dérivé hémi-synthétique de l'artémisinine, de formule chimique  $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_8$  et de MM égale à 384,421 g/mol (Figure 5). Le PA se présente physiquement comme une fine poudre blanche et cristalline, très peu soluble dans l'eau (56,2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )(184). Il est rapidement hydrolysé en milieu aqueux à pH acide et neutre en dihydroartémisinine, son métabolite actif (DHA) (Figure 6). L'artésunate est aussi thermolabile ce qui complique sa conservation dans les pays tropicaux (185). Dans le sang, il est rapidement dégradé par les estérases circulantes en DHA. La DHA est donc responsable de l'essentiel de son effet antipaludique. Le profil physicochimique de cette dernière n'est pas

meilleur : elle est pratiquement insoluble en milieu aqueux et est de même hydro et thermolabile. *In vivo*, elle est métabolisée dans le foie par les isoenzymes du cytochromes P450 (CYP450 2B6, 2C19, 3A4) et par glucuronoconjugaison(138,147,185–188). Un travail de pré-formulation galénique conséquent est donc nécessaire pour pallier les propriétés physicochimiques défavorables de l'artésunate et pour développer une forme galénique adaptée à la voie IN.

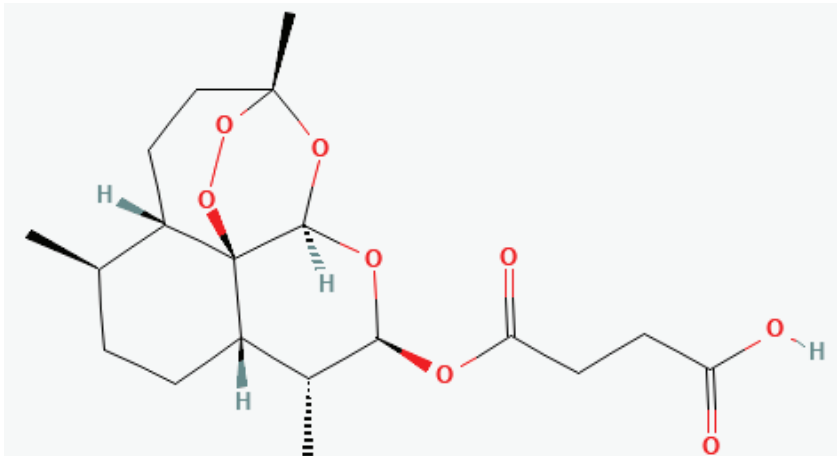


Figure 5. Structure chimique de l'artésunate (186)

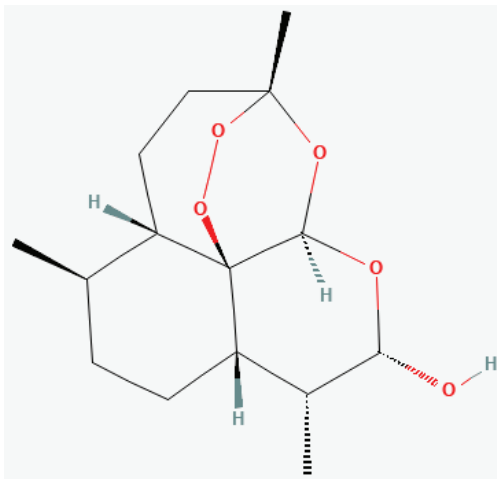


Figure 6. Structure chimique de la DHA (187)

## II. PARTIE EXPÉRIMENTALE

### 1) Description de l'approche expérimentale

L'objectif principal du doctorat était d'explorer, *in vitro*, le potentiel de la voie nasale pour l'administration du traitement de pré-transfert du paludisme. Le principe actif de ce traitement est l'artésunate, dérivé de l'artémisinine largement utilisé pour traiter les formes simples et graves du paludisme. Le travail expérimental a été réalisé en trois grand axes, décrits ci-dessous.

#### **Axe 1 : Etude des paramètres pharmacocinétiques de l'artésunate**

Nous avons débuté notre travail de recherche par une revue de la littérature sur la pharmacocinétique de l'artésunate (PK). Les paramètres PK d'un PA servent à identifier son intervalle thérapeutique, c'est-à-dire, l'intervalle de concentrations plasmatiques qui permet d'obtenir l'effet thérapeutique optimal tout en limitant les effets indésirables. L'artésunate est reconnu pour son effet parasiticide puissant, rapide sur la plupart des stades sanguins de *Plasmodium* ainsi que pour la faible fréquence de ses effets indésirables(7,13,189). Les doses recommandées pour le traitement du paludisme sévère sont faibles lorsque l'on considère le profil de tolérance favorable de la molécule (2,4 mg/kg/j pour les patients > 20 kg). Dans un contexte d'émergence de résistances aux dérivés de l'artémisinine, une escalade des doses d'artésunate pourrait améliorer la clairance parasitaire sans impacter négativement la balance bénéfice-risque du traitement. C'est pour vérifier ce postulat que nous avons initié cet axe de travail. Les études sur la PK de l'artésunate sont nombreuses mais le manque de standardisation dans les protocoles d'études complexifie l'analyse comparative des données. Le travail de cet axe avait donc pour objectifs finaux :

- De synthétiser les paramètres PK de l'artésunate pour différentes voies d'administration (orale, IV, Intramusculaire IM et IR) et de les décrire en prenant en compte les différences dans les protocoles d'études
- De confirmer l'existence d'une corrélation linéaire positive entre dose d'artésunate administrée et exposition plasmatique du patient aux médicaments (apprécié par l'étude des paramètres PK dose-dépendants)
- D'apprécier l'impact de l'émergence de résistances sur l'efficacité du traitement par artésunate et mesurer les risques d'échecs thérapeutiques

Les résultats de cette étude ont été publiés en 2019 dans l'International Journal of Infectious Diseases: « Systematic review of artesunate pharmacokinetics: Implication for treatment of resistant malaria » (DOI : <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.08.030>)

### **Axe 2 : Etude de faisabilité in vitro du traitement de pré-transfert du paludisme par voie IN**

Les objectifs de cet axe étaient de (i) choisir un modèle de muqueuse nasale adapté aux besoins de l'étude, (ii) développer des formulations tests d'artésunate et (iii) évaluer la perméation (= diffusion) et la toxicité de ces formulations sur le modèle choisi.

L'étude a été réalisée sur le modèle de muqueuse nasale humaine RPMI 2650, décrit initialement par Reichl et Becker(176). Il est obtenu par cultures successives des cellules cancéreuses RPMI 2650 en condition immergée (dans le milieu de culture) puis à l'interface air-liquide. Nous avons choisi ce modèle notamment car il mime certains paramètres de la muqueuse nasale humaine excisée. Sa culture est de plus standardisée et permet d'obtenir des résultats reproductibles(176,190).

Les essais de perméation et de cytotoxicité sur modèle RPMI 2650 ont été réalisés en utilisant une formulation solide (mélange pulvérulent) et une solution d'artésunate à reconstitution extemporanée. Au début de chaque essai, un aliquote de formulation, appelé aussi milieu donneur, est introduit dans le compartiment donneur, au pôle apical des cellules. Le PA diffuse ensuite du compartiment donneur vers le compartiment receveur. L'échantillonnage régulier de ce dernier permet de quantifier la diffusion de l'actif. La comparaison de la valeur initiale de TEER à celle mesurée en fin de test de perméation permet d'apprécier l'évolution de l'intégrité du modèle (fonction barrière) et de conclure sur la toxicité de la formulation testée.

Les résultats de cette étude sont présentés dans un article, en cours de préparation pour soumission à Malaria Journal et intitulé : « An *in vitro* proof of concept study of a pre-referral nasal treatment for acute malaria ».

### **Axe 3 : Développement de méthodes d'analyse d'échantillons d'artésunate**

Les tests de perméation de l'axe 2 ont généré des échantillons d'artésunate qu'il était nécessaire d'analyser pour quantifier la diffusion de l'artésunate à travers le modèle d'étude. Cependant, nous ne disposons pas au laboratoire d'une méthode de dosage validée. Le dosage de l'artésunate est généralement complexe parce qu'il nécessite du matériel coûteux et volumineux (Spectromètre de masse, unité HPLC). L'instabilité aqueuse de la molécule implique aussi de pouvoir doser son métabolite principal, la DHA, au risque de sous-estimer sa diffusion. La

première tentative de développement d'une méthode LC-MS/MS a été réalisée en coopération avec le Centre Commun de Spectrométrie de Masse de l'ICBMS. Elle a été infructueuse pour manque de sensibilité de la méthode. Une deuxième tentative a été initiée en coopération avec le Laboratoire de Pharmacotoxicologie de l'hôpital Lyon Sud (Hospices Civiles de Lyon). La méthode développée utilise du matériel de pointe (spectromètre de masse triple quadrupôle) et est sensible et spécifique de l'artésunate. Appliquée au dosage de la DHA, elle génère cependant des résultats aberrants en surestimant la concentration de la molécule dans les échantillons tests. Il était donc nécessaire d'explorer d'autres méthodes de dosage pour mener à bien ce travail. Nous avons ainsi entrepris de développer deux méthodes simples d'analyses d'échantillons d'artésunate en modifiant le protocole du test de chimiosensibilité de l'artésunate sur *Pf*(191,192). La première méthode, quantitative, avait pour objectif de déterminer la concentration en artésunate d'un échantillon X à partir de son effet d'inhibition de croissance sur *Pf*. La deuxième méthode, semi-quantitative, avait pour but de comparer l'effet d'un échantillon X à celui d'une référence de concentration égale à la  $CI_{50}$  de l'artésunate. En reliant l'effet global d'un échantillon à sa concentration en PA, ces méthodes permettent de s'affranchir de la nécessité de doser artésunate et DHA séparément. Les tests de chimiosensibilité sont de plus faciles à mettre en place et déjà réalisés en routine dans les laboratoires du monde entier travaillant sur le paludisme(193). Ils sont donc réalisables sans surcoût même en zone d'endémie où le manque de ressources peut être un réel frein à la recherche.

Les résultats de cet axe sont décrits dans un article, soumis et en cours de relecture à Parasite: « Assessment of quantitative and semi-quantitative methods of artesunate biological *in vitro* test ».



## 2) [Article 1: « Systematic review of artesunate pharmacokinetics: Implication for treatment of resistant malaria »](#)

International Journal of Infectious Diseases 89 (2019) 30–44



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Infectious Diseases

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijid](http://www.elsevier.com/locate/ijid)



### Systematic review of artesunate pharmacokinetics: Implication for treatment of resistant malaria



Yobouet Ines Kouakou<sup>a</sup>, Michel Tod<sup>b</sup>, Gilles Leboucher<sup>b</sup>, Adeline Lavoignat<sup>a</sup>, Guillaume Bonnot<sup>a</sup>, Anne-Lise Bienvenu<sup>a,b,\*</sup>, Stephane Picot<sup>a,c,1</sup>

<sup>a</sup>ICBMS CNRS 5246, SMITH, Malaria Research Unit, Campus Lyon-Tech La Doua, Lyon University, Lyon, France

<sup>b</sup>Groupe Hospitalier Nord, Service Pharmacie, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

<sup>c</sup>Groupe Hospitalier Nord, Institut de Parasitologie et Mycologie Médicale, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

#### ARTICLE INFO

##### Article history

Received 4 July 2019

Received in revised form 23 August 2019

Accepted 28 August 2019

Corresponding Editor: Eskild Petersen, Aarhus, Denmark

#### ABSTRACT

**Background:** Artesunate (ART) is an artemisinin derivative used as monotherapy for the treatment of severe malaria and in combination with a partner drug for non-severe malaria. Resistance of malaria parasites to artemisinins have emerged in Southeast Asia. Adjustment of drug regimen may be an option to prevent therapeutic failures considering the relative favourable safety profile of ART high doses.

**Methods:** For that purpose, a systematic review was done using PubMed, Scopus and Web of Science databases. All studies on ART and DHA pharmacokinetic post-administration of artesunate in human patients or volunteers were included. The Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) checklist 2009 was used.

**Findings:** Fifty studies exploring oral, intravenous, rectal, and intramuscular route (1470 persons, volunteers and patients) were included. Correlations between artesunate doses and  $C_{max}$  or  $AUC_{0-\infty}$  of dihydroartemisinin (DHA) and DHA+ART were evaluated. This correlation was good ( $R^2 > 0.9$ ) using intravenous (IV) route. DHA and ART+DHA average concentrations ( $C_{av}$ ) were well above estimated *in vivo* half-maximal effective concentration ( $EC_{50}$ ) for intravenous route, but this was not the case for oral route.

**Interpretation:** The favorable  $C_{av}/EC_{50}$  ratio for IV route provides evidence that IV ART will remain efficient even in the case of increased resistance level, whereas for the oral route, a two-fold increase in  $EC_{50}$  may lead to therapeutic failures, thus providing a rationale for oral dose escalation. Considering the inter-individual variability of ART pharmacokinetic, Therapeutic Drug Monitoring through antimalarial stewardship activities is needed to optimize drug exposure and avoid resistance development.

© 2019 The Author(s). Published by Elsevier Ltd on behalf of International Society for Infectious Diseases. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

#### Introduction

Significant progress has been made in the fight against malaria during the last decade, whereas this trend stalled in the last three years (World Health Organization, 2018). Intravenous (IV) artesunate (ART) is the first line drug to treat severe malaria. Where complete treatment of severe malaria is not possible but injections are available, a single intramuscular (IM) dose of ART must be given as a pre-referral treatment. When IM injections of ART are not available, only children <6 years must be treated with a single

rectal dose of ART before immediate reference to a higher level facility. Artesunate is a hemisuccinate ester of dihydroartemisinin (DHA), known as the most potent compound of the class of artemisinin derivatives. Artesunate is also included in drug combination (artemisinin-based combined therapies: ACTs) to be used orally for non-severe malaria treatment.

Resistance poses one of the greatest threats to malaria control and is responsible for increased malaria-related morbidity and mortality (Lubell et al., 2014; Oужи et al., 2018). This threat is particularly alarming as the use of ACTs, considered the gold standard antimalarials, was demonstrated to be associated with slow parasitic clearance in South-East Asia (Imwong et al., 2017). Under-dosing of antimalarial drugs contributes in part to an increase in resistance (Barnes et al., 2008) particularly in children (Hawkes et al., 2015a,b). The drug regimens remained as low as possible to obtain antimalarial effects leading to oral doses as low

\* Corresponding author. Groupe Hospitalier Nord, Service Pharmacie, Hospices Civils de Lyon, 103 Grande Rue de la Croix-Rousse, F-69004, Lyon, France.  
E-mail address: [anne-lise.bienvenu@chu-lyon.fr](mailto:anne-lise.bienvenu@chu-lyon.fr) (A.-L. Bienvenu).

<sup>1</sup> Joint last authors.

<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.08.030>

1201-9712/© 2019 The Author(s). Published by Elsevier Ltd on behalf of International Society for Infectious Diseases. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



as 2 mg/kg to obtain high efficacy in non-severe malaria (Angus et al., 2002; Barnes et al., 2008).

It was very recently stressed that adjustments of an artemisinin regimen has to be seriously considered (Wang et al., 2019). Extended treatment duration was proposed to increase parasites exposure to artemisinins in case of delayed parasite clearance phenotype. A second option could be to increase the dose of artemisinins. Most of the dose escalation studies were designed to treat orally non-severe malaria patients (Bethell et al., 2011; Metzger et al., 2012; Das et al., 2013). These studies failed to demonstrate a positive effect of dose increase on parasite clearance time, clinical and parasitological failures in the context of non-severe malaria with ART total doses no higher than 42 mg/kg (Bethell et al., 2011).

ART demonstrated anticancer activity in pre-clinical models leading to prospective studies of intravenous (IV) ART in patients with advanced malignancies (Hou et al., 2008; Krishna et al., 2015; Picot, 2015; von Hagens et al., 2017, 2019). One of these studies determined the maximum tolerated dose to be as high as 18 mg/kg using a D1/D8, 3 weeks cycle of administration (108 mg/kg total dose) (Deeken et al., 2018), higher than maximum recommended doses to treat severe malaria (IV: 4 mg/kg bw/dose, IR:10 mg/kg bw) and higher than dose-escalation studies performed during non-severe malaria (Bethell et al., 2011). It should be kept in mind that 19% of patients receiving 42 mg/kg became neutropenic within 14 days during that study. Injectable artesunate during severe malaria was proven to be associated with a low incidence of adverse events including post-artemisinin delayed haemolysis (PADH) (Fanello et al., 2017; Roussel et al., 2017). A wide therapeutic window, as well as the relative favorable safety profile of ART, may give an opportunity to re-assess the ART regimen in malaria, based on pharmacokinetics (PK) and pharmacodynamics (PD) information.

The need for more PK and PD controlled studies of accurate antimalarial drugs was stressed a decade ago (Barnes et al., 2008). The PK and PD properties of ART were extensively described but some degree of uncertainty remained, supporting an extensive review of literature. Data from an increasing number of studies have been accumulated since the last comprehensive review in 2011 and more recent reviews focus on the impact of resistance on pharmacodynamic properties in non-severe malaria (Morris et al., 2011a; Das et al., 2017, 2018). It is expected that this data analysis would provide significant contribution on pharmacokinetics.

## Methods

### Bibliographic research

An extensive search for studies published before January 2019 was performed using three databases: MEDLINE, Web of Science (WoS) and Scopus. Key words of interest were "artesunate" and "pharmacokinetic". Search details are as follows: ("artesunate" [MeSH Terms] OR "artesunate"[All Fields]) AND (pharmacokinetic [All Fields] OR pharmacokinetic[All Fields] OR pharmacokinetic, [All Fields] OR pharmacokinetic[All Fields] OR pharmacokinetic [All Fields] OR pharmacokinetics[All Fields] OR pharmacokinetician[All Fields] OR pharmacokineticians[All Fields] OR pharmacokineticist[All Fields] OR pharmacokineticists[All Fields] OR pharmacokineticity[All Fields] OR pharmacokineticparameters [All Fields] OR pharmacokineticpharmacodynamic[All Fields] OR pharmacokineticpharmacodynamics[All Fields] OR pharmacokineticproperties[All Fields] OR pharmacokineticrich[All Fields] OR pharmacokinetics[All Fields] OR pharmacokinetics[All Fields] OR pharmacokinetics[All Fields] OR pharmacokineticsand[All Fields] OR pharmacokineticsclinical[All Fields] OR pharmacokineticsclinical[All Fields] OR pharmacokineticsgermany[All Fields] OR

pharmacokineticsishenyang[All Fields] OR pharmacokineticsm[All Fields] OR pharmacokineticspharmacodynamics[All Fields] OR pharmacokineticstudiesconductedinalbinospraguedawleyratsshowed[All Fields] OR pharmacokineticstype[All Fields]) for PUBMED MEDLINE; TOPIC: (artesunate) AND TOPIC: (pharmacokinetic\*) for Web of Science; (TITLE-ABS-KEY (artesunate) AND TITLE-ABS-KEY (pharmacokinetic\*)) for Scopus. No filter or date limitations were used. To increase the completeness of the search, a snowballing approach was used. The duplicates were removed. The remaining papers were then assessed for eligibility by one author (YIK), based on their abstract, title and key words. The full texts of the eligible records were assessed to determine those to be included. Inclusion and exclusion criterion were established a priori. All studies on ART and DHA pharmacokinetic post-administration of ART in human patients or volunteers were included. Reviews, studies in which PK parameters were expressed in DHA equivalents and/or antimalarial activities (results of bioassays), and studies on population PK, were not included.

### Data management

The PRISMA checklist 2009 was used as a methodological support of the systematic review. PK data were extracted from the included studies by one author (YIK) and an independent sampling of those data was done by another author (AL) to ensure their correctness. Information collected included first author, year of publication, type and geographical origins of subjects included, ART and DHA PK parameters, ART regimens and the sampling and analytical protocols. When different physiological statuses (adults, pregnant women, children) were mixed in the same cohort, the PK data of such cohort were not collected. PK parameters expressed as medians were not used in statistical analysis. When the dose expressed in mg/kg was not available but the mean weight of a population group was, it was calculated. PK parameters units were harmonized to allow comparison between data.

### Statistical analysis

Correlation analyses were done to evaluate the impact of ART regimen on PK. The dose-dependent PK parameters (maximal plasmatic concentration ( $C_{max}$ ) and area under the concentration-time curve ( $AUC_{0-\infty}$ )) were expressed as functions of the dose (mg/kg of body weight).  $R^2$  was obtained for ART and DHA taken and for their sum (ART+DHA). When the dose of ART administered could not be retrieved or calculated in a study, the dose-dependent PK parameters were excluded from the correlation analysis. The impact of ART and DHA exposure in terms of anti-parasitic efficacy was evaluated by calculating the average concentration over time ( $C_{av}$ ,  $\mu\text{g/L}$ ) of DHA and ART+DHA in patients after *per os* (PO) and IV ART and comparing them with the half-maximal effective concentration ( $EC_{50}$ , 9.92  $\mu\text{g/L}$ ) of DHA (Das et al., 2017). It was assumed that the ART  $EC_{50}$  was equivalent to DHA  $EC_{50}$ .  $C_{av}$  were calculated using the formula:  $C_{av} = \frac{AUC_{0-\infty} \text{ (for a single dose of ART)}}{24 \text{ (PO) or } 8 \text{ (IV)}}$  (note that  $AUC_{0-\infty}$  after a single dose is equal to AUC over a dosing interval at steady-state).  $C_{av}$  and  $C_{av}/EC_{50}$  were calculated separately for ART and DHA and sums of the  $C_{av}$  and  $C_{av}/EC_{50}$  (ART+DHA) were then calculated). A correlation analysis between DHA  $C_{av}$  and ART+DHA  $C_{av}$  and ART dose was performed. Variability of dose-independent PK parameters ( $t_{1/2}$ ,  $T_{max}$ ,  $V_d$ , and  $CL$ ) was evaluated using their coefficient of variation (CV). Analysis of variance (ANOVA) was used to compare dose-independent PK parameters of *per os* (PO) ART administered alone and in combination. Mann-Whitney rank sum tests were performed to compare dose-independent PK parameters of volunteers and patients for IV and PO routes. All statistical tests were done

using BiostatTGV (Inserm, France, <https://biostatgv.sentiweb.fr/?module=tests>) with a significance level of  $p \leq 0.050$ .

## Results

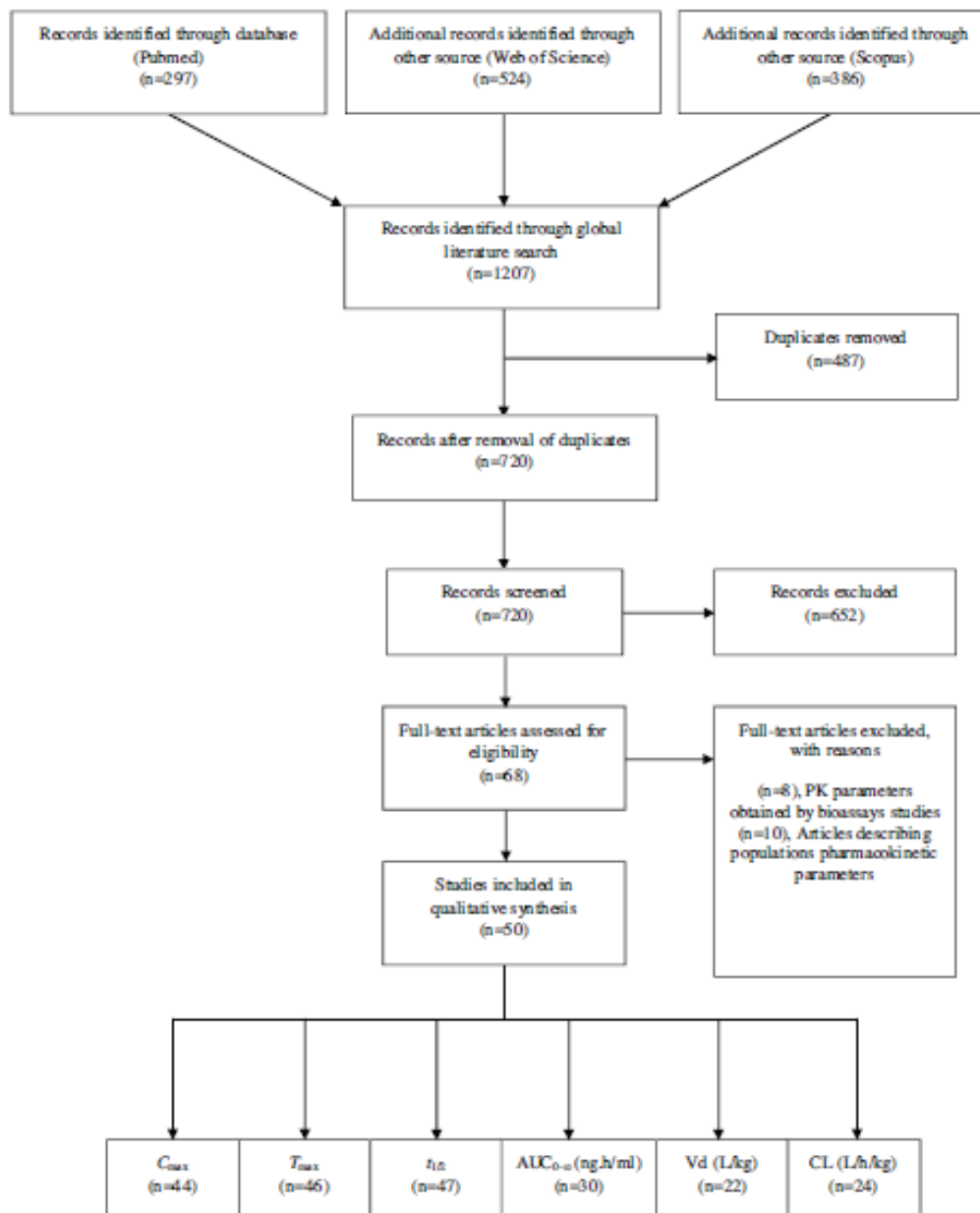
### Included studies

The literature search identified 1207 records through three different sources: 297 for MEDLINE, 386 for SCOPUS and 524 for WoS (Figure 1). After removal of the duplicates, the remaining studies ( $n=720$ ) were screened. In total, 652 records were

excluded as they did not meet the previous selection criteria. The 68 eligible remaining ones were assessed in detail. Fifty studies were included (Table 1). The reasons for exclusion of the 18 studies were the expression of the PK parameters in DHA equivalents and/or antimalarial activity ( $n=8$ ) and the description of populations PK models only ( $n=10$ ).

### Global population description

The included studies were published between 1997 and 2018 (Figure 2). Most of the studies (54%, 27/50) were conducted in



$C_{max}$ =maximal plasmatic concentration;  $T_{max}$ =time to maximal plasmatic concentration;  $t_{1/2}$ =half-life;  $AUC_{0-\infty}$ =area under the concentration-time curve;  $V_d$ =volume of distribution;  $CL$ =clearance

**Figure 1.** Bibliographic research flow chart.

$C_{max}$ = maximal plasmatic concentration;  $T_{max}$ =time to maximal plasmatic concentration;  $t_{1/2}$ =half-life;  $AUC_{0-\infty}$ =area under the concentration-time curve;  $V_d$ =volume of distribution;  $CL$ =clearance.



**Table 1**

Description of the studies included in the review.

| Articles (ref)                | Route of administration | Population treated (n) | Treatment regimen  |
|-------------------------------|-------------------------|------------------------|--|
| Benakis et al. (1997)         | Oral                    | n=6                    | 6 healthy adults (Geneva)<br>200mg of ART once   |
| Karbwang et al. (1998)        | Oral                    | n=11                   | 11 adults with uncomplicated malaria (Thailand)<br>200mg ART at T <sub>0</sub> , followed by 100 mg at T <sub>12h</sub> and then 100mg once daily for another 4 days   |
| Na-Bangchang et al. (1998)    | Oral                    | n=8                    | 8 healthy adults (men, Thailand)<br>300mg of ART either from Guilin or Arenco formulations (crossover study)   |
| Halpaap et al. (1998)         | IR                      | n=12                   | 12 children with uncomplicated falciparum malaria (Gabon)<br>Rectal administration of a single 50 mg ART suppository twice a day (4h interval)   |
| Navaratnam et al. (1998)      | IR, Oral                | n=12                   | 12 healthy adults (Malaysia)<br>Either rectal or oral administration of a single 200 mg dose or artesunate (crossover study)   |
| Batty et al. (1998a)          | IV, Oral                | n=12                   | 12 adults with <i>Plasmodium vivax</i> malaria (Vietnam)<br>120 mg ART administered during a 2 min bolus injection at T <sub>0</sub> followed by 100 mg ART administered PO at T <sub>0h</sub> or vice-versa (crossover study)   |
| Batty et al. (1998b)          | IV, Oral                | n=26                   | 26 adults with uncomplicated falciparum malaria (Vietnam)<br>120 mg ART administered during a 2 min bolus injection at T <sub>0</sub> followed by 100 mg ART administered PO at T <sub>0h</sub> or vice-versa (crossover study)  |
| Davis et al. (2001)           | IV                      | n=30                   | 30 adults with severe <i>Plasmodium falciparum</i> malaria (Vietnam)<br>120 mg of ART (G1: with complications, n=12; G2: without complications, n=8) followed by adequate treatment to ensure healing<br>240 mg of ART (G3: with moderately severe complications, n=10) by IV bolus followed by adequate treatment to ensure healing           |
| Krishna et al. (2001)         | IV, IR                  | n=34                   | 34 children with moderate falciparum malaria (Ghana)<br>G1: 10 mg/kg ART at T <sub>0</sub> (IR) followed by 2.4 mg/kg (IV) Art at T <sub>12h</sub><br>G2: 20 mg/kg ART at T <sub>0</sub> (IR) followed by 2.4 mg/kg (IV) Art at T <sub>12h</sub><br>G3: 2.4 mg/kg ART et T <sub>0</sub> (IV) followed by 20 mg/kg ART (IR) et T <sub>12h</sub> |
| Binh et al. (2001)            | IV, Oral                | n=25                   | G1: 10 healthy Vietnamese adults, 120 mg ART at T <sub>0</sub> (IV) followed by 150 mg ART and T <sub>0h</sub> (Oral)<br>G2: 7 healthy Vietnamese adults, 120 mg ART (IV)<br>G3: 8 Vietnamese adults with uncomplicated falciparum malaria, 150 mg ART (Oral)  |
| Teja-Isavadharm et al. (2001) | Oral                    | n=12                   | G1: 6 adult men with uncomplicated falciparum malaria, 100 mg ART once (Thailand)<br>G2: 6 healthy adult men, 100 mg ART once (Thailand)   |
| Zhang et al. (2001)           | Oral                    | n=10                   | 10 healthy adults (Vietnam)<br>100 mg ART once   |
| Ilett et al. (2002)           | IV, IM                  | n=24                   | G1: 12 adults (Vietnam) with uncomplicated falciparum malaria, 120 mg ART at T <sub>0</sub> (IV bolus) followed by 120 mg ART at T <sub>0h</sub> (IM) or vice versa (crossover arm)<br>G2: 12 adults (Vietnam) with uncomplicated falciparum malaria, 120 mg ART (IV bolus)  |
| Batty et al. (2002)           | Oral                    | n=8                    | 8 healthy adults (Australia)<br>150 mg ART once  |
| Nealon et al. (2002)          | IV, IM                  | n=28                   | 28 children with severe falciparum malaria (Gabon)<br>G1: 2.4 mg/kg ART (IV) at T <sub>0</sub> followed by 1.2 mg/kg ART (IM) at T <sub>12h</sub> (n=11)<br>G2: 2.4 mg/kg ART at T <sub>0</sub> (IM) followed by 1.2 mg/kg ART (IV) at T <sub>12h</sub> (n=10)   |
| Awad et al. (2004)            | Oral, IR                | n=12                   | 12 healthy adults (Sudan)<br>200 mg ART once (crossover study)   |
| Na-Bangchang et al. (2004)    | Oral                    | n=20                   | 20 healthy adults (Thailand)<br>4 mg/kg ART once   |
| Hien et al. (2004)            | IM                      | n=9                    | 9 adults with severe falciparum malaria (Vietnam)<br>2.4 mg/kg ART (stat) followed by 1.2 mg/kg daily  |
| Chanthap et al. (2005)        | Oral                    | n=15                   | 15 healthy adults (Cambodia)<br>4 mg/kg ART once coadministered with mefloquine  |
| Newton et al. (2006)          | IV                      | n=17                   | 17 adults with severe falciparum malaria (Thailand)<br>2.4 mg/kg at T <sub>0</sub> (stat) followed by 1.2 mg/kg et T <sub>12h</sub> and 1.2 mg/kg once every 24 h  |
| Davis et al. (2007)           | Oral                    | n=20                   | 20 healthy adult men (Australia), treatment regimen in two period<br>Period 1 (P1): 200 mg ART once a day for 3 days followed by a washout period<br>Period 2 (P2): 200 mg ART once a day for 3 days coadministered with mefloquine  |
| Sirivichayakul et al. (2007)  | IR                      | n=17                   | 17 Children with uncomplicated falciparum malaria (Thailand) receiving either 10 (G1) or 20 (G2) mg/kg/d ART once a day for 3 days   |
| Ramharter et al. (2007)       | Oral                    | n=24                   | 24 children (Gabon) with uncomplicated falciparum malaria receiving either granules of a fixed ART-mefloquine formulation (GA: n=12, 4 mg/kg/d once a day for 3 days) or co-tablets blisters of another artesunate-mefloquine combination (GB: n=12, 4 mg/kg/day once a day for 3 days)  |
| Orrell et al. (2008)          | Oral                    | n=15                   | 15 healthy adults (Africa) receiving either 4 mg/kg of ART alone (ART) or coadministered with amodiaquine (ACT) once (crossover study)   |
| Ramharter et al. (2008)       | Oral                    | n=60                   | 60 children (Gabon) with uncomplicated falciparum malaria receiving coformulation tablets of ART-pyronaridine (GA, GB, GC) or coformulation granules of the same molecules (GD)<br>Median doses of ART per group: 2.1 (n=15), 3.3 (n=15), 4.8 (n=15) and 3.8 (n=15) mg/kg/d for GA, GB, GC and GD respectively, once daily for 3 days          |
| Diem Thuy et al. (2008)       | Oral                    | n=10                   | 10 healthy adult men (Vietnam)<br>200 mg ART once a day for 5 days   |
| Dondorp et al. (2009)         | Oral                    | n=80                   | 80 patients with uncomplicated falciparum malaria on two sites: 40 adults and children in Cambodia and 40 adults in Thailand<br>On each site, patients received either ART as a monotherapy (G1: 2 mg/kg/d for 7 days, n=20) or coadministered with mefloquine (G2: 4 mg/kg/d for 3 days and 10 mg/kg on day 4, n=20)                          |
| Navaratnam et al. (2009)      | Oral                    | n=24                   | 24 healthy adults (Malaysia)<br>Oral administration of a fixed or a non-fixed combination of 200 mg ART coadministered with amodiaquine, once (crossover study)  |

Table 1 (Continued)

| Articles (ref)                | Route of administration | Population treated (n) | Treatment regimen  |
|-------------------------------|-------------------------|------------------------|--|
| Sinou et al. (2009)           | Oral                    | n= 13                  | 13 adults with acute uncomplicated <i>falciparum</i> malaria (Democratic Republic of Congo)<br>200mg ART once a day for 3 days coadministered with amodiaquine   |
| Li et al. (2009)              | IV                      | n= 30                  | 30 healthy adults<br>0.5 (G1, n=6), 1 (G2, n=6), 2 (G3, n=6), 4 (G4, n=6) or 8 (G5, n=6) mg/kg ART once (IV bolus)   |
| Miller et al. (2009)          | Oral                    | n= 86                  | 86 adults with acute uncomplicated <i>falciparum</i> malaria (Malawi and Gambia)<br>1 (n= 30), 2 (n= 29) or 4mg/kg (n=27) ART once a day for 3 days coadministered with dapsone and chlorproguanil   |
| Mwesigwa et al. (2010)        | Oral                    | n= 21                  | 21 children with uncomplicated <i>falciparum</i> malaria (Uganda)<br>4mg/kg ART twice a day for 3 days coadministered with amodiaquine   |
| Krudsood et al. (2010)        | Oral                    | n= 50                  | 50 adults with uncomplicated <i>falciparum</i> malaria (Thailand)<br>G1: fixed tablet of 200 mg ART with mefloquine once a day for 3 days (n= 25)<br>G2: non-fixed combination of 4 mg/kg ART with mefloquine once a day for 3 days (n= 25)  |
| Oryamboko et al. (2011)       | Oral                    | n= 51                  | 26 pregnant women, the same 26 women at 3 months postpartum and 25 non-pregnant women with asymptomatic uncomplicated <i>falciparum</i> malaria (Democratic Republic of Congo)<br>200mg ART once   |
| Fortin et al. (2011)          | Oral                    | n= 60                  | 60 healthy adult men (India)<br>100 mg ART once as a fixed (G1) or non-fixed (G2) combination with amodiaquine (crossover study)   |
| Chinh et al. (2011)           | Oral                    | n= 18                  | 18 healthy adults (Vietnam)<br>200mg ART once a day for 3 days coadministered with azithromycin  |
| Byakika-Kibwika et al. (2012) | IV                      | n= 14                  | 14 adults with severe <i>falciparum</i> malaria (Uganda)<br>2.4mg/kg ART at T <sub>0</sub> , T <sub>12h</sub> , T <sub>24h</sub> and then and once daily until oral treatment was possible   |
| Pehintola et al. (2012)       | Oral                    | n= 21                  | 10 HIV positive adults (Nigeria) under ARV treatment (G1) and 11 HIV positive patients without ARV treatment (G2)<br>200mg ART once a day for 3 days coadministered with amodiaquine   |
| Miller et al. (2012)          | IV                      | n= 24                  | 24 healthy adults<br>2 (G1, n=8), 4 (G2, n=8) or 8 (G3, n=8) mg/kg ART once a day for 3 days   |
| McGready et al. (2012)        | IV, Oral                | n= 20                  | 20 pregnant women with acute uncomplicated <i>falciparum</i> malaria and 14 of those women postpartum (Thailand)<br>4mg/kg ART (IV) on day 0 followed by 4 mg/kg ART (oral) for 6 days OR 4mg/kg ART (oral) on day 0 followed by 4mg/kg ART (IV) on day 1 and then oral ART at the same dose daily for 5 days                          |
| Morris et al. (2012)          | Oral                    | n= 34                  | 34 Healthy volunteers (Switzerland)<br>Arm A: Ritonavir (day 0–day 17, n=17) with a fixed formulation of Pyronaridine-ART (day8–day10, n=17)<br>Arm B: fixed formulation of pyronaridine-ART only for 3 days (n= 17)<br>ART dosing was 180 mg when < 65 kg and 240mg when ≥ 65 kg  |
| Saunders et al. (2012)        | Oral                    | n= 143                 | 143 adults with uncomplicated <i>falciparum</i> malaria (Cambodia)<br>2 (G1, n=75), 4 (G2, n=40) or 6 (G3, n=28) mg/kg ART once a day for 7 days   |
| Kyaw et al. (2013)            | Oral                    | n= 52                  | 52 Adults with uncomplicated <i>falciparum</i> malaria (Myanmar)<br>4mg/kg/ ART once a day for 7 days with 8 oz. of milk on days 0–6   |
| Matar et al. (2014)           | Oral                    | n= 16                  | 16 healthy adults (Sudan)<br>200mg ART once as a monotherapy or coadministered with sulfadoxine/pyrimethamine  |
| Li et al. (2014)              | IV                      | n= 28                  | 28 adults with uncomplicated <i>falciparum</i> malaria (Kenya)<br>2.4mg/kg ART once a day for 2 days (2 min infusion)  |
| Valea et al. (2014)           | Oral                    | n= 48                  | 24 pregnant women and 24 non-pregnant women with uncomplicated <i>falciparum</i> malaria (Burkina Faso)<br>3.6mg/kg ART once a day for 3 days coadministered with mefloquine (coformulation)   |
| Liu et al. (2014)             | Oral                    | n= 31                  | 31 healthy men (China), comparison of two coformulation of ART-Amodiaquine 100/270 mg per tablet (Artesun®; ASAQ Wintrop®)<br>Study in 4 periods (separated by washout periods): On each period, 200 mg ART administered as 2 cp of Artesun® or ASAQ Wintrop® (crossover study)  |
| Jittamala et al. (2015)       | Oral                    | n= 17                  | 17 healthy adults (Thailand, crossover study)<br>G1: 180mg ART in a fixed formulation of ART-Pyronaridine<br>G2: 180mg ART in the same fixed formulation of ART-Pyronaridine coadministered with primaquine  |
| Rattanapunya et al. (2015)    | Oral                    | n= 16                  | 16 healthy adults (Thailand); Regimen in 3 periods (P1–P3)<br>P1: 200 mg ART coadministered with mefloquine once a day for 3 days (washout period of 2 month)<br>P2: Boosted lopinavir (LPV/r) for 14 days (no washout period between P2 and P3)<br>P3: ART with mefloquine (same doses as in P1) coadministered with LPV/r for 3 days |
| Walimbwa et al. (2018)        | Oral                    | n= 13                  | 13 healthy adults (Uganda)<br>4mg/kg ART once a day for 3 days coadministered with amodiaquine   |

ART = artesunate; GX = group X; T<sub>x</sub> = dosing time; ACT = artemisinin-based combination therapy; HIV = human immunodeficiency virus; ARV = antiretroviral; IV = intravenous; PO = per os; IR = intrarectal; IM = intramuscular.

South-East Asian countries, mainly in Thailand (10/27) and Vietnam (9/27). The other studies were conducted in Africa (34%, 17/50) and in other continents such as North America, Oceania and Europa (12%, 6/50). The global population (n = 1470) corresponds to volunteers (all non-pregnant adults, n = 479, 32.6%) and patients (n = 991, 67.4%). Among patients, 856 (58.2%) had non-severe *falciparum* malaria (NS), 112 (7.6%), severe *falciparum* malaria, and 23 (1.6%), a malaria-infection caused by *P. vivax*. The patients were also segregated as follows: non-pregnant adults (n = 688, 46.8%), pregnant women

(n = 90, 6.1%), and children (n = 213, 14.5%). Adults were defined as people of 15 years and above.

#### Sampling regimen and analytical methods

There was a significant variability in sampling regimen (Figure 3). In most cases, heparin (lithium or potassium) was used (38%, 19/50) as anticoagulant, followed by fluoride-oxalate derivatives (32%, 16/50) and EDTA (2%, 1/50). For 14 studies



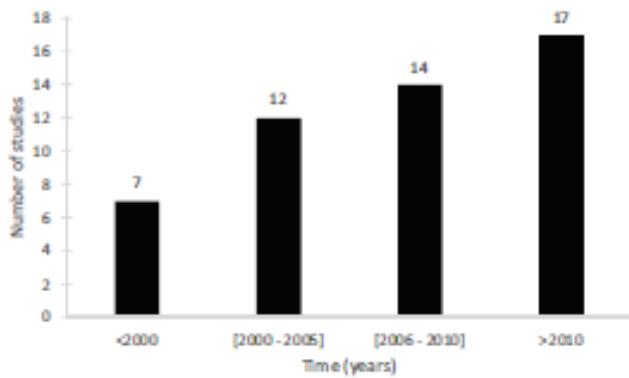


Figure 2. Publication time-slate of the studies included in the present review.

(28%, 14/50), there were no indications of the anticoagulant used. The plasma was stored at least below  $-20^{\circ}\text{C}$  (range:  $-20$  to  $-80^{\circ}\text{C}$ ) until analytical procedures; for the samples stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  and  $-25^{\circ}\text{C}$ , fluoride-oxalate was used in most cases (6/7). There were three different techniques to quantify ART and DHA including high-pressure LC-MS/MS (56%, 28/50), HPLC with electrochemical detection (HPLC-ECD, 22%, 11/50), and HPLC with subsequent UV detection (20%, 10/50). One article did not specify the HPLC method used to quantify ART and DHA (Sinou et al., 2009).

#### Population and studies description sort by administration route

Doses of ART administrated and distribution of studies sorted per route of administration are described in Table 2. IV route was infrequently used to explore the PK of ART and DHA (Figure 4). The drug was administered as a 2 min infusion (8/13), a bolus of less than five seconds (1/13), a slow-bolus of 3–4 min (1/13), a 4 h infusion (1/13), or by other unspecified protocols (3/13). Oral route was the most used (38/50 studies) (Figure 4). Artesunate was administered as tablets, powder or granules, alone (17/38) or coadministered with another drug (21/38).

For coadministrations, seven studies used ART+mefloquine (MQ,  $n=212$ ), seven studies ART+amodiaquine (AMQ,  $n=140$ ), one study ART+pyronaridine ( $n=57$ ), and six other studies ART+either azithromycin (1/38,  $n=18$ ), sulfadoxine/pyrimethamine (1/38,  $n=16$ ), pyronaridine-ritonavir (1/38,  $n=33$ ), chloroguanil-dapsone (1/38,  $n=86$ ), nevirapine-amodiaquine (1/38,  $n=21$ ), or pyronaridine-primaquine (1/38,  $n=15$ ) for a total population of 598 ( $n=260$  volunteers and  $n=338$  patients). Oral ART was taken with water after a period of fasting (11/38), with milk (1/38) (Kyaw et al., 2013), independently of meals (1/38) (Krudsood et al., 2010), after a meal (1/38) (Valea et al., 2014), or using other protocols (24/38). Five studies out of 50 explored the IR route, and three, the IM route (Figure 4). Out of the 68 patients of the intrarectal (IR) group, the 24 volunteers received their dose after an overnight fast. For IM route, ART was administered in the anterior thigh (2/3,  $n=30$ ) or in the gluteal muscle (1/3,  $n=11$ ).

#### PK-PD data obtained after IV administration of ART

Mean and median values of  $C_{\text{max}}$  and  $\text{AUC}_{0-\infty}$  are presented in Table 3. The correlation analysis of dose-dependent parameters (DHA  $C_{\text{max}}$  (Figure 5) and DHA  $\text{AUC}_{0-\infty}$  (Figure 6)) obtained for the whole population and the volunteers demonstrated  $R^2$  above 0.920 except for DHA  $C_{\text{max}}$  ( $R^2=0.656$ ) in the whole population. The correlation analysis of the sum (ART+DHA) of  $C_{\text{max}}$  (Figure 5) and  $\text{AUC}_{0-\infty}$  (Figure 6) showed  $R^2$  above 0.970 for the whole population and for volunteers. No correlation analysis was performed in patient groups because of limited data. Mean and median values of  $T_{\text{max}}$  (time to maximal plasmatic concentration),  $t_{1/2}$  (half-life), Vd (volume of distribution), and CL (clearance) for ART and DHA are presented in Table 3. ART and DHA  $t_{1/2}$  were significantly longer ( $p=0.018$  and  $p=0.012$  respectively) in volunteers ( $9.17 \pm 3.96$  min for ART and  $79.06 \pm 25.01$  min for DHA) than in patients ( $4.07 \pm 2.61$  min for ART and  $51.78 \pm 14.27$  min for DHA). DHA Vd was significantly more increased ( $p=0.00016$ ) in volunteers ( $1.97 \pm 0.31$  L/kg) than in patients ( $0.83 \pm 0.16$  L/kg), and ART CL was significantly more reduced ( $p=0.022$ ) in volunteers ( $1.67 \pm 0.56$  L/h/kg) than in patients ( $2.40 \pm 0.59$  L/h/kg).

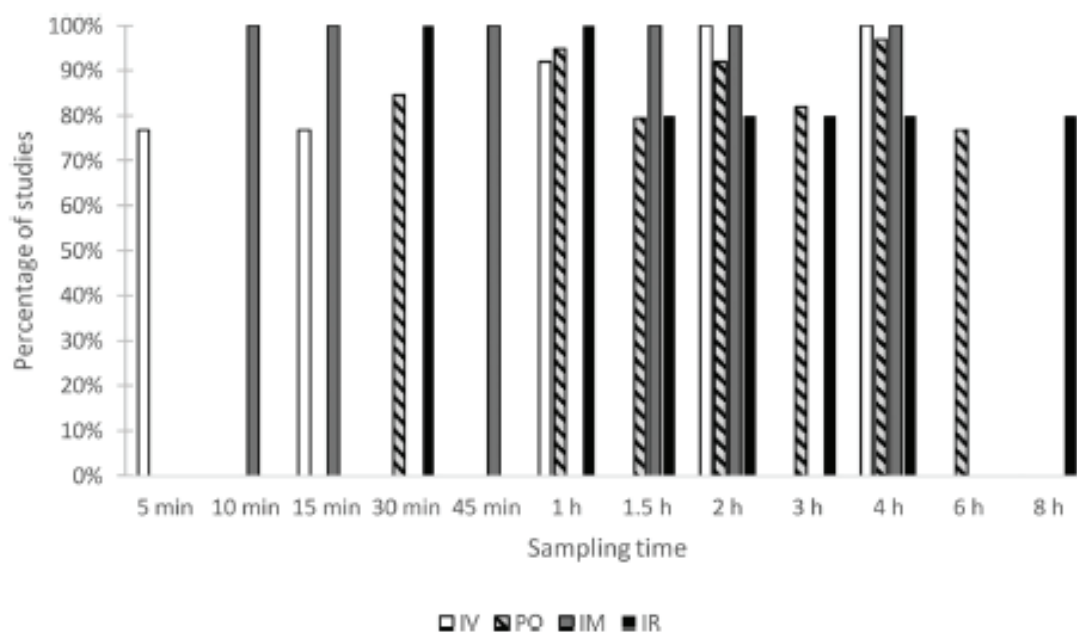


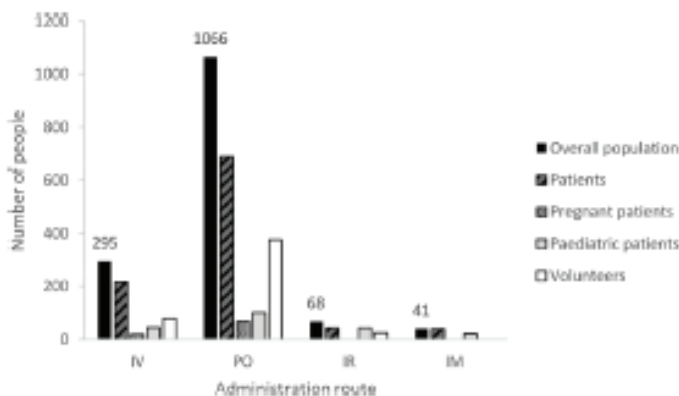
Figure 3. Description of the most frequent blood sampling times by administration route.

A sampling time was considered as frequent when it was described in at least 75% of the studies of an administration route. 48 studies out of 50 (96%) reported having sampled blood before dosing. IV = intravenous; PO = per os; IR = intrarectal; IM = intramuscular.

**Table 2**  
Description of the dose of ART administered and the number of studies per PK parameters.

| Administration route | Dose of ART administered (mg/kg or mg) |                         |                           | Number of studies per PK parameters |                         |                         |                         |                        |                        |
|----------------------|--|-------------------------|---------------------------|-------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|
|                      | Volunteers                             | Adults patients         | Paediatric patients       | $C_{max}$                           | $T_{max}$               | $t_{1/2}$               | $AUC_{0-\infty}$        | Vd or Vd/F             | Cl. or Cl/F            |
| IV                   | 120mg <sup>a</sup>                     | 120–240mg <sup>a</sup>  | NA                        | ART: 5/13 <sup>†</sup>              | ART: 3/13 <sup>†</sup>  | ART: 8/13 <sup>†</sup>  | ART: 7/13 <sup>†</sup>  | ART: 7/13 <sup>†</sup> | ART: 7/13 <sup>†</sup> |
|                      | 0.5–8 mg/kg <sup>b</sup>               | 2.4–4mg/kg <sup>b</sup> | 1.2–2.4mg/kg <sup>b</sup> | 3/13 <sup>a</sup>                   | 1/13 <sup>a</sup>       | 4/13 <sup>a</sup>       | 3/13 <sup>a</sup>       | 4/13 <sup>a</sup>      | 4/13 <sup>a</sup>      |
|                      |  |                         |                           | DHA: 5/13 <sup>†</sup>              | DHA: 4/13 <sup>†</sup>  | DHA: 8/13 <sup>†</sup>  | DHA: 8/13 <sup>†</sup>  | DHA: 7/13 <sup>†</sup> | DHA: 6/13 <sup>†</sup> |
|                      |  |                         |                           | 8/13 <sup>a</sup>                   | 7/13 <sup>a</sup>       | 5/13 <sup>a</sup>       | 4/13 <sup>a</sup>       | 4/13 <sup>a</sup>      | 5/13 <sup>a</sup>      |
| PO                   | 100–300 mg <sup>a</sup>                | 100–200 mg <sup>a</sup> | NA                        | ART: 17/38 <sup>†</sup>             | ART: 14/38 <sup>†</sup> | ART: 13/38 <sup>†</sup> | ART: 8/38 <sup>†</sup>  | ART: 3/38 <sup>†</sup> | ART: 4/38 <sup>†</sup> |
|                      | 100–200 mg <sup>b</sup>                | 200mg <sup>b</sup>      | NA                        | 8/38 <sup>a</sup>                   | 14/38 <sup>a</sup>      | 9/38 <sup>a</sup>       | 3/38 <sup>a</sup>       | 4/38 <sup>a</sup>      | 5/38 <sup>a</sup>      |
|                      | 4 mg/kg <sup>a</sup>                   | 2–6mg/kg <sup>b</sup>   | NA                        | DHA: 19/38 <sup>†</sup>             | DHA: 15/38 <sup>†</sup> | DHA: 23/38 <sup>†</sup> | DHA: 12/38 <sup>†</sup> | DHA: 2/38 <sup>†</sup> | DHA: 2/38 <sup>†</sup> |
|                      | 4 mg/kg <sup>b</sup>                   | 1–4mg/kg <sup>b</sup>   | 2–4.8 mg/kg <sup>b</sup>  | 11/38 <sup>a</sup>                  | 19/38 <sup>a</sup>      | 14/38 <sup>a</sup>      | 6/38 <sup>a</sup>       | 4/38 <sup>a</sup>      | 5/38 <sup>a</sup>      |
|                      |  |                         |                           | ART: 2/5 <sup>†</sup>               | ART: 2/5 <sup>†</sup>   | ART: NA                 | ART: NA                 | ART: NA                | ART: NA                |
|                      |  |                         |                           | 1/5 <sup>a</sup>                    | 1/5 <sup>a</sup>        | 1/5 <sup>a</sup>        | 1/5 <sup>a</sup>        | NA                     | NA                     |
| IR                   | 200 mg <sup>a</sup>                    | NA                      | 50 mg <sup>a</sup>        | DHA: 2/5 <sup>†</sup>               | DHA: 3/5 <sup>†</sup>   | DHA: NA                 | DHA: NA                 | DHA: NA                | DHA: NA                |
|                      | NA                                     | NA                      | 9.3–20 mg/kg <sup>b</sup> | 2/5 <sup>a</sup>                    | 2/5 <sup>a</sup>        | 2/5 <sup>a</sup>        | 2/5 <sup>a</sup>        | 1/5 <sup>a</sup>       | 1/5 <sup>a</sup>       |
|                      |  |                         |                           | ART: 1/5 <sup>†</sup>               | ART: 1/5 <sup>†</sup>   | ART: 1/5 <sup>†</sup>   | ART: 1/5 <sup>†</sup>   | ART: NA                | ART: NA                |
|                      |  |                         |                           | 1/5 <sup>a</sup>                    | 1/5 <sup>a</sup>        | 1/5 <sup>a</sup>        | 1/5 <sup>a</sup>        | NA                     | NA                     |
| IM                   | NA                                     | 120 mg <sup>a</sup>     | NA                        | ART: 3/3 <sup>†</sup>               | ART: 2/3 <sup>†</sup>   | ART: 2/3 <sup>†</sup>   | ART: 2/3 <sup>†</sup>   | ART: 2/3 <sup>†</sup>  | ART: 2/3 <sup>†</sup>  |
|                      | NA                                     | 2.4 mg/kg <sup>b</sup>  | 1.2–2.4mg/kg <sup>b</sup> | NA                                  | NA                      | 1/3 <sup>†</sup>        | 1/3 <sup>†</sup>        | 1/3 <sup>†</sup>       | 1/3 <sup>†</sup>       |
|                      |  |                         |                           | 3/3 <sup>a</sup>                    | 2/3 <sup>a</sup>        | 2/3 <sup>a</sup>        | 2/3 <sup>a</sup>        | 2/3 <sup>a</sup>       | 2/3 <sup>a</sup>       |
|                      |  |                         |                           | DHA: NA                             | DHA: NA                 | DHA: 1/3 <sup>†</sup>   | DHA: 1/3 <sup>†</sup>   | DHA: 1/3 <sup>†</sup>  | DHA: 1/3 <sup>†</sup>  |
|                      |  |                         |                           | NA                                  | NA                      | 1/3 <sup>†</sup>        | 1/3 <sup>†</sup>        | 1/3 <sup>†</sup>       | 1/3 <sup>†</sup>       |
|                      |  |                         |                           | 3/3 <sup>a</sup>                    | 3/3 <sup>a</sup>        | 2/3 <sup>a</sup>        | 2/3 <sup>a</sup>        | 2/3 <sup>a</sup>       | 2/3 <sup>a</sup>       |

ART = artesunate; DHA = dihydroartemisinin; PK = pharmacokinetic; IV = intravenous; PO = per os; IR = intrarectal; IM = intramuscular;  $C_{max}$  = maximal plasmatic concentration;  $T_{max}$  = time to maximal plasmatic concentration;  $t_{1/2}$  = half-life;  $AUC_{0-\infty}$  = area under the concentration-time curve; Vd = volume of distribution; Vd/F = apparent volume of distribution; Cl. = clearance; Cl/F = apparent clearance; NA = Non-Applicable; <sup>a</sup> ART administered alone (PO route); <sup>b</sup> ART administered in a combination (PO route); <sup>†</sup> ART dose given in mg in the studies; <sup>‡</sup> ART dose given in mg/kg in the studies; <sup>†</sup> mean data type; <sup>a</sup> median data type.



**Figure 4.** Distribution of the population of study by administration route.

There were 112 cases of severe falciparum malaria (IV: 82; IM: 30), 856 cases of non-severe falciparum malaria (IV: 122; PO: 679; IM: 11; IR: 44) and 23 cases of vivax malaria (IV: 12; PO: 11). IV = intravenous; PO = per os; IR = intrarectal; IM = intramuscular.

#### PK-PD data obtained after PO administration of ART

Mean and median values of  $C_{max}$  and  $AUC_{0-\infty}$  are presented in Table 3. The correlation analysis of dose-dependent parameters (DHA  $C_{max}$  (Figure 7) and DHA  $AUC_{0-\infty}$  (Figure 8)) were obtained for the whole population, volunteers, and patients. The correlation of  $C_{max}$  (Figure 7) and  $AUC_{0-\infty}$  (Figure 8) was improved using the sum of ART+DHA. The very low correlation between  $C_{max}$  and doses in volunteers could be explained by the tight dose-range tested. DHA and ART+DHA  $C_{av}$  and  $C_{av}/EC_{50}$  were calculated for patients after oral administration of ART (Table 3). The correlation analysis demonstrated that  $C_{av}$  increased with ART dose after oral administration (Figure 9). Mean and median values of  $T_{max}$ ,  $t_{1/2}$ , Vd/F (apparent volume of distribution), and Cl/F (apparent

clearance) for ART and DHA are presented in Table 3. ART and DHA  $t_{1/2}$  were significantly shorter ( $p = 0.011$  and  $p = 0.0034$  respectively) in people who received ART alone ( $0.50 \pm 0.05$  h for ART and  $0.94 \pm 0.39$  h for DHA) than in people who received ART in combination with AMQ ( $0.82 \pm 0.46$  h for ART and  $1.64 \pm 0.70$  h for DHA). DHA  $t_{1/2}$  was also significantly shorter ( $p = 0.043$ ) after administration of ART alone ( $0.94 \pm 0.39$  h) than after administration of ART with pyronaridine ( $1.30 \pm 0.51$  h). ART Vd/F and Cl/F were significantly reduced when ART was administered alone ( $11.92 \pm 3.06$  L/kg and  $16.88 \pm 4.04$  L/h/kg respectively;  $p = 0.029$ ) than when administered in combination with pyronaridine ( $32.50 \pm 7.00$  L/kg and  $28.00 \pm 2.16$  L/h/kg respectively;  $p = 0.029$ ). DHA  $t_{1/2}$  was significantly longer ( $p = 0.043$ ) in volunteers ( $1.38 \pm 0.66$  h) than in patients ( $0.95 \pm 0.19$  h).

#### Discussion

The artemisinin derivatives are the most potent antimalarial drugs currently used, with artesunate being the first line treatment for severe malaria. A number of cases of delayed haemolytic anaemia after injectable artesunate for severe malaria have been described, but successfully managed with transfusions. However, according to the Experts Group Meeting on delayed haemolytic anaemia following treatment with injectable artesunate, the high clinical benefits of artesunate compared to quinine must be emphasized to ensure the continued use of injectable artesunate considered as a life-saving treatment in severe malaria. Healthcare professionals should be made aware of the potential of ART for haemolytic anaemia and the need for continued monitoring of patients for up to one month post treatment, particularly those with high pre-treatment parasitaemia. Increased failure rates were firstly reported in south-east Asia and more recently in Africa (Huong et al., 2001; Sahr et al., 2001; Dondorp et al., 2009). The present study was an extensive review of ART and DHA PK parameters after PO, IV, IM, and IR routes. Fifty studies were



**Table 3**  
Pharmacokinetic parameters per administration route.

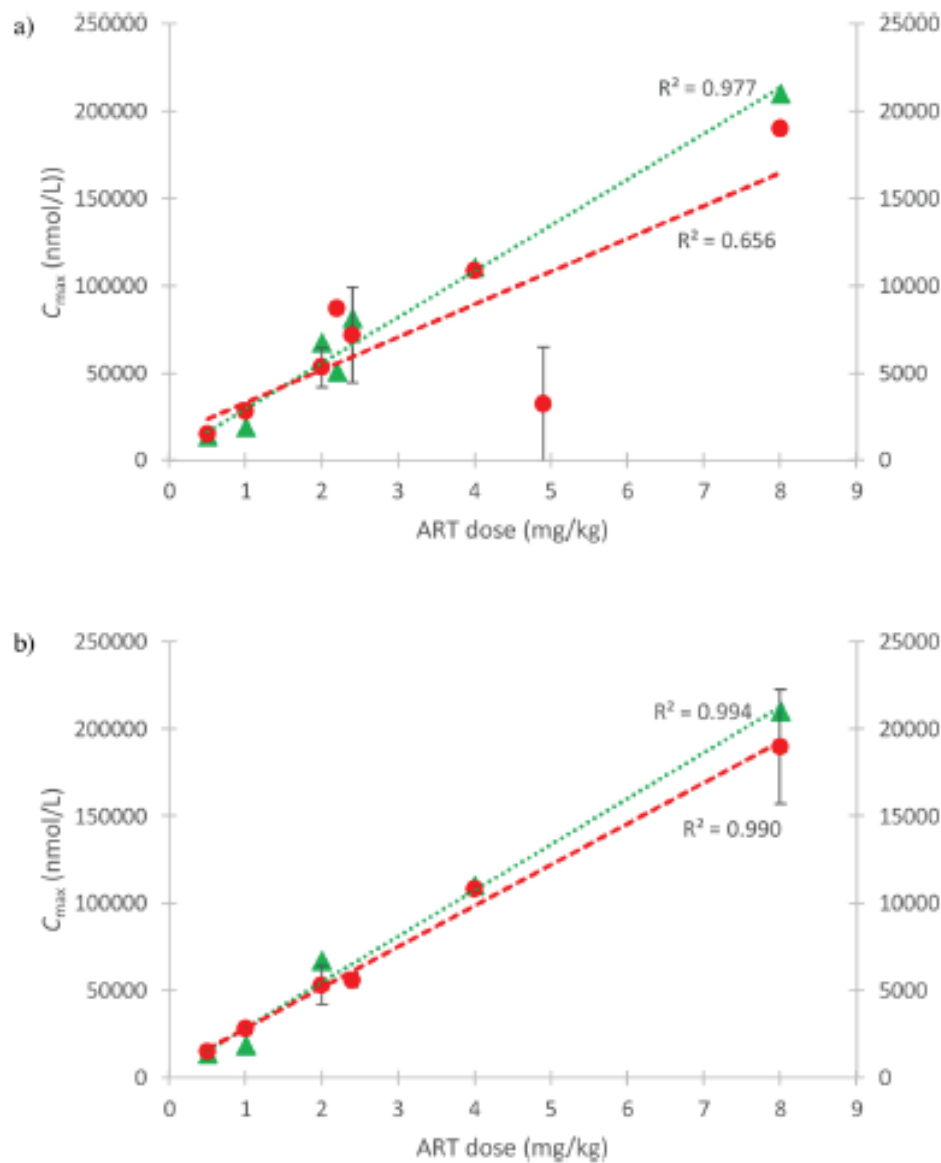
| PK parameters<br>Range (CV) | ART/DHA                      | Administration route    |                      |                      |                        |
|-----------------------------|------------------------------|-------------------------|----------------------|----------------------|------------------------|
|                             |                              | IV                      | PO                   | IR                   | IM                     |
| $C_{max}$ (ng/ml)           | ART (mean data)              | 4,797–83,340            | 48.9–451             | 90–448.5             | NA                     |
|                             | ART dose range (mg/kg)       | 0.5–8                   | 1–6                  | 1.79–3.2             | NA                     |
|                             | DHA (mean data)              | 428–6,056               | 180.4–2,129          | 180–385.6            | NA                     |
|                             | ART dose range (mg/kg)       | 0.5–8                   | 1–6                  | 1.79–3.2             | NA                     |
|                             | ART (median data)            | 3,260–29,677            | 62.9–1,040           | 507–561              | 615–2,195              |
|                             | ART dose range (mg/kg)       | 1.2–4                   | 2–4                  | 10–20                | 1.2–2.4                |
|                             | DHA (median data)            | 605–3,210               | 519–1,850            | 682–1,535            | 341–1,166              |
|                             | ART dose range (mg/kg)       | 1.2–4                   | 2–4                  | 9.3–20               | 1.2–2.4                |
| $T_{max}$ (min OR h)        | ART (mean data)              | 1.7–2 min (5.40%)       | 0.25–1.4 h (40.37%)  | 0.58–1.43 h (59.81%) | NA                     |
|                             | DHA (mean data)              | 7.2–24 min (36.68%)     | 0.5–2.08 h (30.03%)  | 1.13–1.95 h (26.84%) | NA                     |
|                             | ART (median data)            | NA                      | 0.33–1.5 h (40.68%)  | 0.8–1 h (15.71%)     | 7.2–12 min (28.36%)    |
|                             | DHA (median data)            | 0.5–12 min (54.63%)     | 0.5–2.04 h (33.94%)  | 1.5–2 h (CV:11.90%)  | 25.9–45 min (22.47%)   |
| $t_{1/2}$ (min OR h)        | ART (mean data)              | 2.19–14.4 min (61.35%)  | 0.3–1.85 h (51.69%)  | NA                   | NA                     |
|                             | DHA (mean data)              | 36.7–128.4 min (36.89%) | 0.49–3.2 h (46.21%)  | NA                   | NA                     |
|                             | ART (median data)            | 1.5–15 min (52.31%)     | 0.24–0.7 h (28.55%)  | NA                   | 25.2–48.2 min (35.20%) |
|                             | DHA (median data)            | 18–78.6 min (58.68%)    | 0.64–4.02 h (57.50%) | 0.79–1.8 h (39.57%)  | 31.9–52.7 min (19.03%) |
| $AUC_{0-\infty}$ (ng.h/ml)  | ART (mean data)              | 386–6,994               | 64.6–400             | NA                   | NA                     |
|                             | ART dose range (mg/kg)       | 0.5–8                   | 1–4.8                | NA                   | NA                     |
|                             | DHA (mean data)              | 385–10,410              | 433.2–3,837          | NA                   | NA                     |
|                             | ART dose range (mg/kg)       | 0.5–8                   | 1–4.8                | NA                   | NA                     |
|                             | ART (median data)            | 49–1,042                | 62.9–217             | 692–1,076            | 535–856                |
|                             | ART dose range (mg/kg)       | 1.2–4                   | 3–4                  | 10–20                | 1.2–2.4                |
|                             | DHA (median data)            | 418–2,450               | 1,160–2,689          | 2,403–5,633          | 396–1,496              |
|                             | ART dose range (mg/kg)       | 1.2–4                   | 2–4                  | 9.3–20               | 1.2–2.4                |
| Vd or Vd/F (L/kg)           | ART (mean data)              | 0.08–0.24 (33.19%)      | 8.56–41 (54.43%)     | NA                   | NA                     |
|                             | DHA (mean data)              | 0.55–2.403 (45.41%)     | 1.33–4.2 (39.53%)    | NA                   | NA                     |
|                             | ART (median data)            | 0.14–15.2 (201.18%)     | 6.8–26 (49.63%)      | NA                   | 1.9–3.98 (61.75%)      |
|                             | DHA (median data)            | 0.6–2.37 (54.23%)       | 1.91–4.9 (31.07%)    | 4.4–5.9 (20.60%)     | 1.28–1.79 (19.38%)     |
| CL or CL/F (L/h/kg)         | ART (mean data)              | 1.16–3.07 (33.97%)      | 12.9–31.16 (29.41%)  | NA                   | NA                     |
|                             | DHA (mean data)              | 0.48–1.3 (23.70%)       | 1.22–2.7 (23.07%)    | NA                   | NA                     |
|                             | ART (median data)            | 2.33–64 (177.93%)       | 9.6–60 (50.49%)      | NA                   | 2.4–3.48 (18.68%)      |
|                             | DHA (median data)            | 0.75–5.6 (86.34%)       | 1.07–2.2 (24.30%)    | 2.6–3.9 (28.28%)     | 1.18–2.16 (30.98%)     |
| $C_{av}$ ( $\mu$ g/L)       | DHA (mean data)              | 290.63–412.25           | 22.42–123.38         | NA                   | NA                     |
|                             | ART dose range ( $\mu$ g/kg) | 2,200–2,500             | 1,000–4,800          | NA                   | NA                     |
|                             | ART+DHA (mean data)          | 340.13–566.00           | 25.11–133.04         | NA                   | NA                     |
|                             | ART dose range ( $\mu$ g/kg) | 2,200–2,500             | 1,000–4,800          | NA                   | NA                     |
| $C_{av}/EC_{50}$            | DHA (mean data)              | 23.25–41.56             | 2.26–12.44           | NA                   | NA                     |
|                             | ART dose range ( $\mu$ g/kg) | 2,200–2,500             | 1,000–4,800          | NA                   | NA                     |
|                             | ART+DHA (mean data)          | 34.29–57.06             | 2.53–13.41           | NA                   | NA                     |
|                             | ART dose range ( $\mu$ g/kg) | 2,200–2,500             | 1,000–4,800          | NA                   | NA                     |

ART=artesunate; DHA=dihydroartemisinin; PK=pharmacokinetic; CV=coefficient of variation; IV=intravenous; PO=per os; IR=intrarectal;  $C_{max}$ =maximal plasma concentration;  $T_{max}$ =time to maximal plasma concentration;  $t_{1/2}$ =half-life; AUC=area under the concentration-time curve; Vd=volume of distribution; Vd/F=apparent volume of distribution; CL=clearance; CL/F=apparent clearance; NA=Non-Applicable; Dose-independent PK parameters are provided as range (CV) and dose-dependent parameters as range with the corresponding ART dose range (in mg/kg);  $C_{av}$ =average DHA or ART+DHA concentration over time;  $C_{av}$  ( $\mu$ g/L) are presented as a range with the corresponding ART dose range (in  $\mu$ g/kg);  $EC_{50}$ =half-maximal effective concentration equal to 9.92  $\mu$ g/L for DHA as described in a previous study (Das et al., 2017) and is here considered equivalent for both ART and DHA;  $C_{av}/EC_{50}$  provided as a range with the corresponding ART dose range (in  $\mu$ g/kg).

compiled, giving us an overview of the last 22 years (1997–2018). A limitation of this review could be related to grey literature that may have been missed. The discrepancies between the methods used including drug dosages, fasting or not, sampling time, ART and DHA dosage methods, and data reports (mean, median), were taken into account. The impact of these discrepancies demonstrated by the great CV of some dose-independent PK parameters, remained probably low compared to the overall results.

Inter-individual variability may be linked to physiological and pathological differences between subjects (Morris et al., 2011a). In children under 2, the immaturity of enzyme systems may impact the metabolism of drugs (Hines, 2007). Studies on population PK in children (2/3) or in children and adults (1/3) found weight and/or age to be a significant covariable on DHA Vd after rectal or PO administration (Karunajeewa et al., 2004; Simpson et al., 2006; Stepniewska et al., 2009). Pregnancy may also modify drug processing (Pariente et al., 2016). It was reported that pregnancy was associated with a decrease in DHA total exposure ( $AUC_{0-\infty}$ ) coupled with higher plasma drug concentrations after PO

administration of ART (Morris et al., 2011b; Onyamboko et al., 2011) as a consequence of an increase in DHA clearance (Onyamboko et al., 2011). Another study exploring the oral route (Valea et al., 2014) reported an increase in ART total exposure due to deteriorated clearance. A study of the IV route concluded an overall similarity of the PK parameters between pregnant women and the same three month postpartum women (McGready et al., 2012). Effect of food intake was also identified as a significant factor affecting ART absorption rate constant with a reduction in absorption of 84% if ART was administered with a high calorie meal (Tan et al., 2009). The malaria-infection was also reported to have an impact on ART PK (Binh et al., 2001; Teja-Isavadharm et al., 2001; McGready et al., 2012). Acute malaria was reported to reduce the pre-systemic biotransformation of ART thus increasing the oral bioavailability and plasma concentration (McGready et al., 2012). Disease-related reduction of first-pass glucuronidation led to an increase in plasma concentration of DHA (McGready et al., 2012). In two other studies (Binh et al., 2001; Teja-Isavadharm et al., 2001),  $C_{max}$  and  $AUC_{0-\infty}$  of DHA were significantly higher in patients than



**Figure 5.** Correlation analysis between  $C_{max}$  (nmol/L) and dose (mg/kg) after ART IV administration in the whole population and in volunteers. Comparison between DHA  $C_{max}$  (red curve) and the sum of ART  $C_{max}$  and DHA  $C_{max}$  (green curve). Figure (a) presents the results of the correlation analysis in the whole population and figure (b) the results of the correlation analysis in volunteers.  $C_{max}$  were converted from ng/ml to nmol/L using the respective molecular weights of ART (384.421 g/mol) and DHA (284.35 g/mol).  $C_{max}$  = maximal plasmatic concentration; ART = artesunate; IV = intravenous; DHA = dihydroartemisinin.

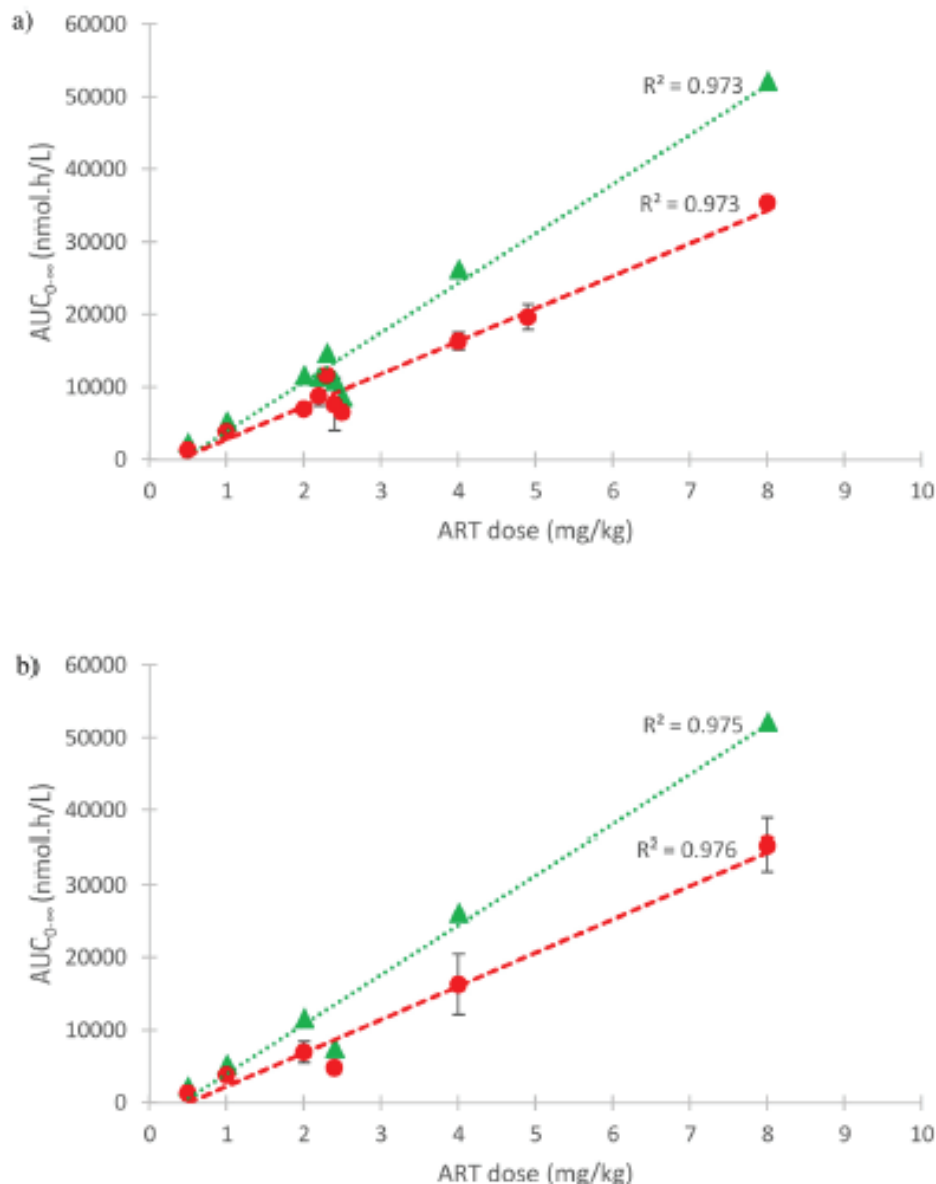
in volunteers. DHA  $t_{1/2}$  was shorter for patients compared to volunteers for IV and oral routes, as well as ART  $t_{1/2}$  for IV route. Moreover, there was a significant decrease in DHA Vd and increase in ART CL for patients treated with intravenous ART. These observations may be a consequence of an increased binding of drugs to alpha-1-acid glycoprotein during acute malaria leading to a reduction in the apparent volume of distribution (Meshnick et al., 1996). Combination of ART with amodiaquine led to a longer DHA  $t_{1/2}$  whereas no significant influence of pyronaridine on ART and DHA PK was reported (Orrell et al., 2008; Tan et al., 2009).

The differences in studies' methodology, including the sampling time are another source of variability which limits the reproducibility of PK data. After IV administration of ART, blood sampling should start in the minutes after dosing because of the short ART  $t_{1/2}$ . The anticoagulant used may also impact the PK parameters (Lindegardh et al., 2008): fluoride-oxalate, by disabling the plasma esterases, reduces the *ex-vivo* degradation of ART into DHA and is also responsible for blood cells shrinkage, which

increases plasma volume. Fluoride-oxalate was used as the anticoagulant in 16/50 studies. The differences in sensitivity of the analytical method is another potential source of variability (Morris et al., 2011a). Inter-individual variability due to fast or slow metabolizers has not been described for ART.

It is of interest to anticipate the issue of potential decreased artesunate efficacy during severe malaria in a context of rise of artemisinins resistance in non-severe malaria. The first step was to provide a comprehensive review of the pharmacokinetic properties of ART and DHA through correlation analyses and Cav calculations. For IV administration, a positive correlation between dose and  $C_{max}$  ( $R^2=0.99$ ) or  $AUC_{0-\infty}$  ( $R^2=0.97$ ) was found in volunteers. The previous correlation analysis was essentially based on two studies (Li et al., 2009; Müller et al., 2012) made by the same research team. For the oral route, a positive correlation was found for  $C_{max}$  in patients ( $R^2=0.9$ ) but not in volunteers ( $R^2=0.5$ ). As expected, correlation analyses were improved if ART and DHA PK parameters were summed. These analyses demonstrated a linear



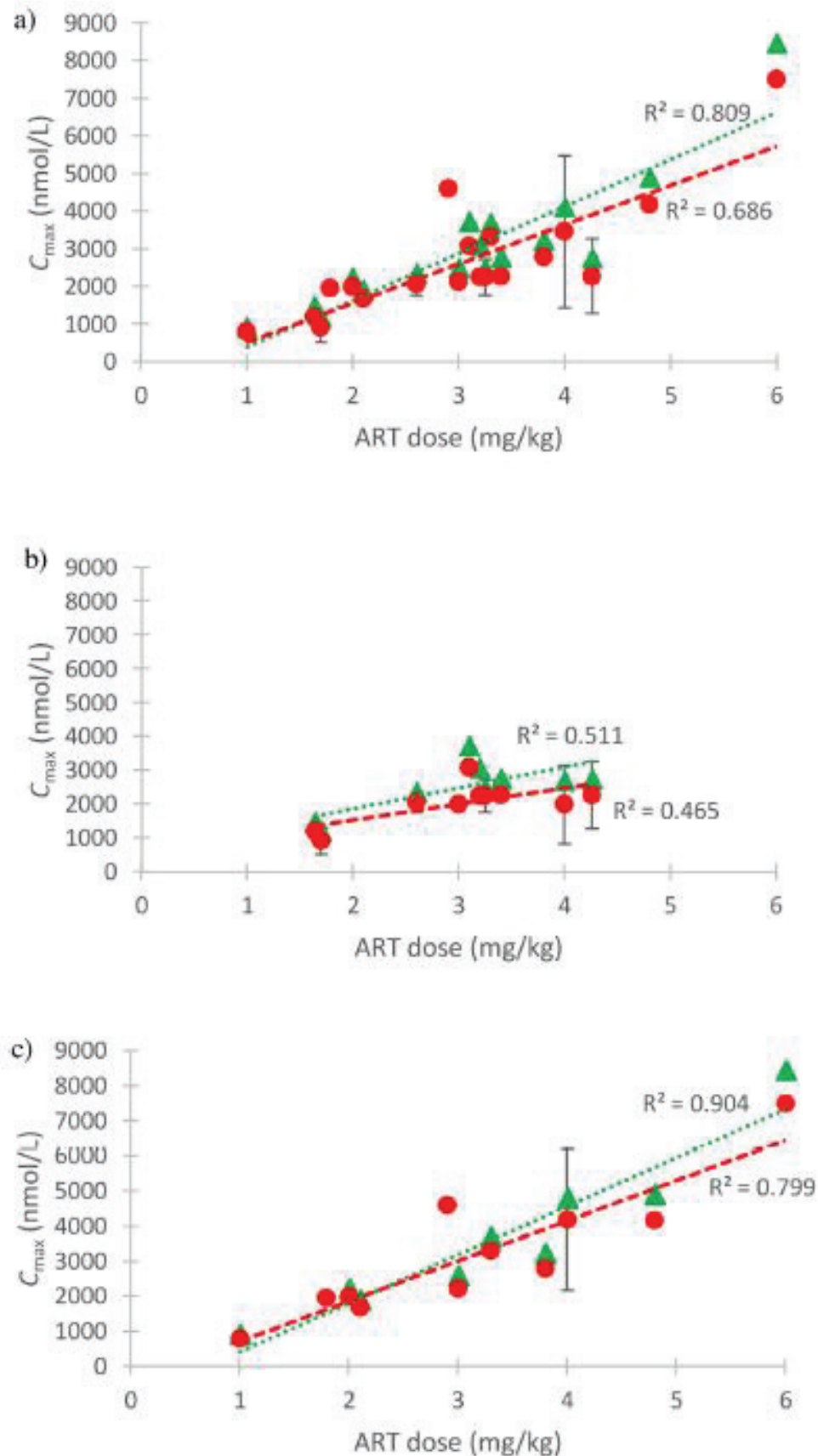


**Figure 6.** Correlation analysis between  $AUC_{0-\infty}$  (nmol.h/L) and dose (mg/kg) after ART IV administration in the whole population and in volunteers. Comparison between DHA  $AUC_{0-\infty}$  (red curve) and the sum of ART  $AUC_{0-\infty}$  and DHA  $AUC_{0-\infty}$  (green curve). Figure (a) presents the results of the correlation analysis in the whole population and figure (b) the results of the correlation analysis in volunteers.  $AUC_{0-\infty}$  were converted from ng h/ml to nmol h/L using the respective molecular weights of ART (384.421 g/mol) and DHA (284.35 g/mol). AUC = area under the concentration-time curve; ART = artesunate; IV = intravenous; DHA = dihydroartemisinin.

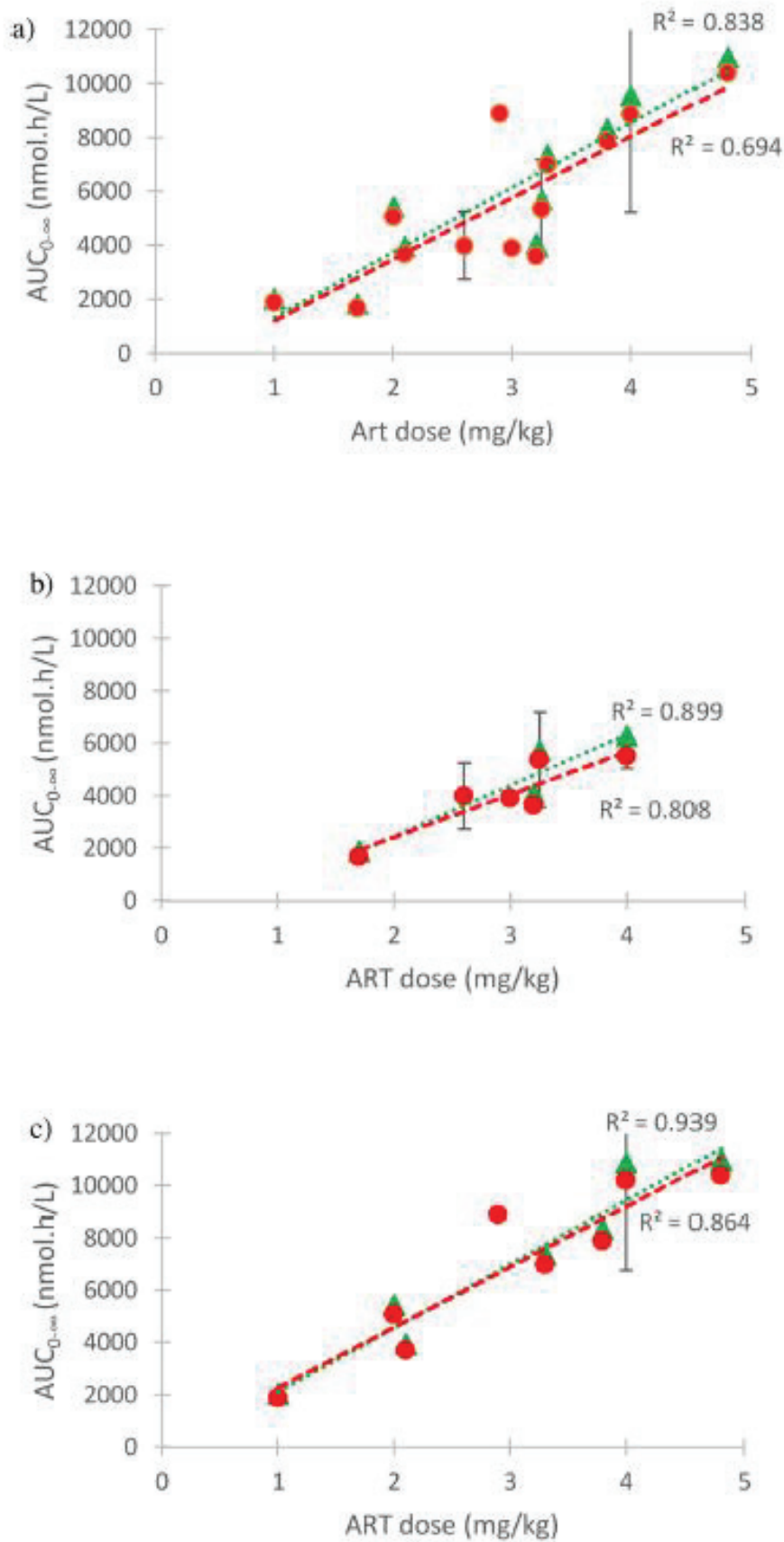
relationship between ART dose and some PK parameters for IV and oral routes. DHA and ART + DHA  $C_{av}$  increased with dose escalation of ART after oral administration, as demonstrated by correlation analyses. Intravenous route led to  $C_{av}$  values of 340 to 566  $\mu\text{g/L}$ , well above *in vivo*  $EC_{50}$  value (9.92  $\mu\text{g/L}$ ) (Das et al., 2017). The oral route led to  $C_{av}$  values of 22 to 123  $\mu\text{g/L}$ . Thus, the ratio  $C_{av}/EC_{50}$  is much higher for the intravenous route (34 to 57) than for the oral route (2.5 to 13.4). This difference means that in the case of increase in the *in vivo* half-maximal effective concentration due to resistance, the therapeutic window will remain highly favorable for the intravenous route but will be limited for the oral route. Assuming a concentration dependent parasite killing (Das et al., 2017), an increase in  $C_{av}$  may have an impact on parasite clearance time. Besides  $C_{av}$ , another key determinant of outcome during severe malaria is the interval from starting treatment to the time to maximal plasmatic concentration ( $T_{max}$ ) (Barnes et al., 2008). This  $T_{max}$  is approximately 2 min for intravenous ART and 7 to 24 min for

DHA, leading to excellent efficacy provided the  $C_{max}$  is higher than the minimum parasiticidal concentrations (MPC). The MPC in blood to clear the parasites during severe malaria is not experimentally documented. One could suspect that the MPC during severe malaria is different from the MPC during non-severe malaria due to the role of parasites sequestration in the brain vasculature and the effect of high parasitemias. The challenge of obtaining prospectively *in vivo* MPC of antimalarial drugs was recalled while this threshold was successfully estimated for the new antimalarial cipargamin (Halpaap et al., 1998; Na-Bangchang et al., 1998).

Considering the great inter-individual variability of ART and DHA PK parameters, Therapeutic Drug Monitoring (TDM) is a cornerstone in the fight against ART resistance development (Bienvenu et al., 2019) and the management of ART side effects such as delayed haemolysis or neutropenia linked to high doses (Bethell et al., 2011). TDM may be promoted through antimalarial

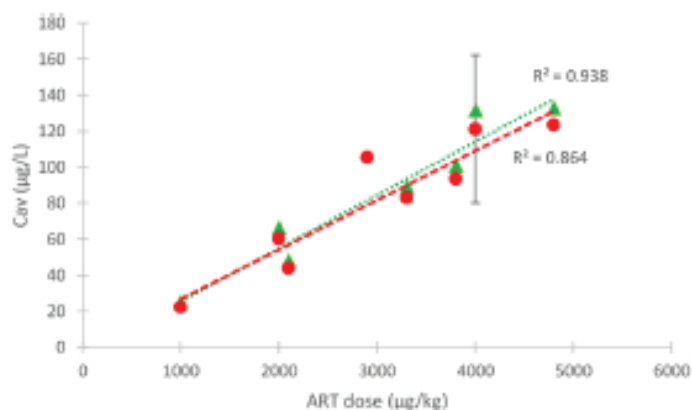


**Figure 7.** Correlation analysis between  $C_{max}$  (nmol/L) and dose (mg/kg) after ART PO administration in the whole population, in volunteers, and in patients. Comparison between DHA  $C_{max}$  (red curve) and the sum of ART  $C_{max}$  and DHA  $C_{max}$  (green curve). Figure (a) presents the results of the correlation analysis in the whole population, figure (b) the results of the correlation analysis in volunteers, and figure (c) the results of the correlation analysis in patients.  $C_{max}$  were converted from ng/ml to nmol/L using the respective molecular weights of ART (384.421 g/mol) and DHA (284.35 g/mol).  $C_{max}$  = maximal plasmatic concentration; ART = artesunate; PO = per os; DHA = dihydroartemisinin.



**Figure 8.** Correlation analysis between AUC<sub>0-∞</sub> (nmol.h/L) and dose (mg/kg) after ART PO administration in the whole population, in volunteers, and in patients. Comparison between DHA AUC<sub>0-∞</sub> (red curve) and the sum of ART AUC<sub>0-∞</sub> and DHA AUC<sub>0-∞</sub> (green curve). Figure (a) presents the results of the correlation analysis in the whole population, figure (b) the results of the correlation analysis in volunteers, and figure (c) the results of the correlation analysis in patients. AUC<sub>0-∞</sub> were converted from ng.h/ml to nmol.h/L using the respective molecular weights of ART (384.421 g/mol) and DHA (284.35 g/mol). AUC = area under the concentration-time curve; ART = artesunate; PO = per os; DHA = dihydroartemisinin.





**Figure 9.** Correlation analysis between Cav (DHA and the sum of ART and DHA, in µg/L) and dose (µg/kg) after ART PO administration in patients. Comparison between DHA Cav (red curve) and the sum of ART Cav and DHA Cav (green curve). Cav were first calculated for ART and DHA separately with the formula previously described in the material and methods section. Then, for each given dose of ART administered per os, ART and DHA respective Cav were summed. Cav = concentration over time; DHA = dihydroartemisinin; ART = artesunate; PO = per os.

stewardship programs, whose goal are to optimize clinical outcomes while minimizing unintended consequences of drug use, including emergence of resistance, selection of pathogenic organisms, and toxicity.

#### Author contribution

YIK performed the bibliographic search, the data collection, and prepared the first draft. MT and GL reviewed the paper. AL and GB checked the accuracy of data collection. ALB and SP launched the study, prepared the study design, analyzed data and references, wrote, and edited the manuscript.

#### Funding

None.

#### Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

#### Conflict of interest

None.

#### Acknowledgments

None.

#### References

Angus BJ, Thaiporn I, Chanthapadith K, Suputtamongkol Y, White NJ. Oral artesunate dose-response relationship in acute falciparum malaria. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46(March (3)):778–82.

Awad MI, Eltayeb IB, Baraka OZ, Behrens RH, Alkadru AMY. Pharmacokinetics of artesunate following oral and rectal administration in healthy Sudanese volunteers. *Trop Doct* 2004;34(July (3)):132–5.

Barnes KI, Watkins WM, White NJ. Antimalarial dosing regimens and drug resistance. *Trends Parasitol* 2008;24(March (3)):127–34.

Batty KT, Ilett KE, Powell SM, Martin J, Davis TME. Relative bioavailability of artesunate and dihydroartemisinin: investigations in the isolated perfused rat liver and in healthy Caucasian volunteers. *Am J Trop Med Hyg* 2002;66(February (2)):130–6.

Batty KT, Le AT, Ilett KE, Nguyen PT, Powell SM, Nguyen CH, et al. A pharmacokinetic and pharmacodynamic study of artesunate for vivax malaria. *Am J Trop Med Hyg* 1998a;59(November (5)):823–7.

Batty KT, Thu LT, Davis TM, Ilett KE, Mai TX, Hung NC, et al. A pharmacokinetic and pharmacodynamic study of intravenous vs oral artesunate in uncomplicated falciparum malaria. *Br J Clin Pharmacol* 1998b;45(February (2)):123–9.

Benakis A, Paris M, Loutan I, Plessas CT, Plessas ST. Pharmacokinetics of artemisinin and artesunate after oral administration in healthy volunteers. *Am J Trop Med Hyg* 1997;56(January (1)):17–23.

Bethell D, Se Y, Ion C, Tyner S, Saunders D, Sriwichai S, et al. Artesunate dose escalation for the treatment of uncomplicated malaria in a region of reported artemisinin resistance: a randomized clinical trial. *PLoS One* 2011;6(5):e19283.

Bienvenu A-L, Djimdé A, Picot S. Antimalarial stewardship programs are urgently needed for malaria elimination: a perspective. *Parasite Paris Fr* 2019;26:16.

Binh TQ, Ilett KE, Batty KT, Davis TME, Hung NC, Powell SM, et al. Oral bioavailability of dihydroartemisinin in Vietnamese volunteers and in patients with falciparum malaria. *Br J Clin Pharmacol* 2001;51(June (6)):541–6.

Byakika-Kibwika P, Lamorde M, Mayito J, Nabukeera L, Mayanja-Kizza H, Katabira E, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous artesunate during severe malaria treatment in Ugandan adults. *Malar J* 2012;11(1):132.

Chanthap L, Tsuyuoka R, Na-Bangchang K, Nivanna N, Sukson D, Sovannarith T, et al. Investigation of bioavailability, pharmacokinetics and safety of new pediatric formulations of artesunate and mefloquine. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2005;36(January (1)):34–43.

Chinh NT, Quang NN, Anh CX, Thanh NX, Dai B, Birrell GW, et al. Pharmacokinetics and ex vivo antimalarial activity of artesunate-azithromycin in healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55(September (9)):4412–5.

Das D, Tripura R, Phyto AP, Lwin KM, Tarning J, Lee SJ, et al. Effect of high-dose or split-dose artesunate on parasite clearance in artemisinin-resistant falciparum malaria. *Clin Infect Dis* 2013;56(March (5)):e48–58.

Das JL, Dondorp AM, Nosten F, Phyto AP, Hanpithakpong W, Ringwald P, et al. Population pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of artemisinin resistance in Southeast Asia. *AAPS J* 2017;19(November (6)):1842–54.

Das JPL, Kyaw MP, Nyunt MH, Chit K, Aye KH, Aye MM, et al. Population pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of artesunate in patients with artemisinin sensitive and resistant infections in Southern Myanmar. *Malar J* 2018;(March):17.

Davis TME, England M, Dunlop A-M, Page-Sharp M, Cambon N, Keller TG, et al. Assessment of the effect of mefloquine on artesunate pharmacokinetics in healthy male volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51(March (3)):1099–101.

Davis TME, Phuonng HL, Ilett KE, Hung NC, Batty KT, Phuonng VDB, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous artesunate in severe falciparum malaria. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(January (1)):181–6.

Deeken JF, Wang H, Hartley M, Cheema AK, Smaglo B, Hwang JJ, et al. A phase I study of intravenous artesunate in patients with advanced solid tumor malignancies. *Cancer Chemother Pharmacol* 2018;81(March (3)):587–96.

Diem Thuy LT, Ngoc Hung L, Danh PT, Na-Bangchang K. Absence of time-dependent artesunate pharmacokinetics in healthy subjects during 5-day oral administration. *Eur J Clin Pharmacol* 2008;64(October (10)):983–8.

Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyto AP, Tarning J, et al. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med* 2009;361(July (5)):455–67.

Fanello C, Onyamboko M, Lee SJ, Woodrow C, Setaphan S, Chotivanich K, et al. Post-treatment haemolysis in African children with hyperparasitaemic falciparum malaria: a randomized comparison of artesunate and quinine. *BMC Infect Dis* 2017;17(August (1)):575.

Fehintola PA, Scarsi KK, Ma Q, Parikh S, Morse GD, Taiwo B, et al. Nevirapine-based antiretroviral therapy impacts artesunate and dihydroartemisinin disposition in HIV-infected Nigerian adults. *AIDS Res Treat* 2012;2012: Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3303559/>. [Cited 19 November 2018].

Fortin A, Verbeeck RK, Jansen FH. Comparative oral bioavailability of non-fixed and fixed combinations of artesunate and amodiaquine in healthy Indian male volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 2011;67(March (3)):267–75.

von Hagens C, Walter-Sack I, Goeckjan M, Osburg J, Storch-Hagenlocher B, Sertel S, et al. Prospective open uncontrolled phase I study to define a well-tolerated dose of oral artesunate as add-on therapy in patients with metastatic breast cancer (ARTIC M33/2). *Breast Cancer Res Treat* 2017;164(July (2)):359–69.

von Hagens C, Walter-Sack I, Goeckjan M, Storch-Hagenlocher B, Sertel S, Elsässer M, et al. Long-term add-on therapy (compassionate use) with oral artesunate in patients with metastatic breast cancer after participating in a phase I study (ARTIC M33/2). *Phytomedicine Int J Phytother Phytopharm* 2019;54(February):140–8.

Halpaap B, Ndjave M, Paris M, Benakis A, Kremsner PG. Plasma levels of artesunate and dihydroartemisinin in children with *Plasmodium falciparum* malaria in Gabon after administration of 50-milligram artesunate suppositories. *Am J Trop Med Hyg* 1998;58(March (3)):365–8.

Hawkes M, Conroy AL, Opoka RO, Namasopo S, Zhong K, Liles WC, et al. Slow clearance of *Plasmodium falciparum* in severe pediatric malaria, Uganda, 2011–2013. *Emerg Infect Dis* 2015;21(July (7)):1237–9.

Hawkes MT, Fergie S, Brophy J, Crockett M. Artesunate treatment of severe pediatric malaria: a review of parasite clearance kinetics and clinical implications. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2015b;26(October (5)):237–40.

Hien TT, Davis TME, Chuong LV, Ilett KE, Sinh DXT, Phu NH, et al. Comparative pharmacokinetics of intramuscular artesunate and artemether in patients with severe falciparum malaria. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(November (11)):4234–9.



- Hines RN. Ontogeny of human hepatic cytochromes P450. *J Biochem Mol Toxicol* 2007;21(4):169–75.
- Hou J, Wang D, Zhang R, Wang H. Experimental therapy of hepatoma with artemisinin and its derivatives: in vitro and in vivo activity, chemosensitization, and mechanisms of action. *Clin Cancer Res* 2008;14(September (17)):5519–30.
- Huong NM, Hewitt S, Davis TM, Dao LD, Toan TQ, Kim TB, et al. Resistance of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs in a highly endemic area of southern Viet Nam: a study in vivo and in vitro. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001;95(June (3)):325–9.
- Ilett KF, Batty KT, Powell SM, Binh TQ, Thu LTA, Phuong HL, et al. The pharmacokinetic properties of intramuscular artesunate and rectal dihydroartemisinin in uncomplicated falciparum malaria: pharmacokinetics of artesunate and dihydroartemisinin. *Br J Clin Pharmacol* 2002;11(January (1)):23–30.
- Imwong M, Suwanasin K, Kunasol C, Sutawong K, Mayxay M, Rekol H, et al. The spread of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in the Greater Mekong subregion: a molecular epidemiology observational study. *Lancet Infect Dis* 2017;17(5):491–7.
- Jittamala P, Pukrittayakamee S, Ashley EA, Nosten F, Hanboonkunupakarn B, Lee SJ, et al. Pharmacokinetic interactions between primaquine and pyronaridine-artesunate in healthy adult Thai subjects. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59(January (1)):505–13.
- Karbwang J, Na-Bangchang K, Congpoung K, Thanavibul A, Harinasuta T. Pharmacokinetics of oral artesunate in Thai patients with uncomplicated falciparum malaria. *Clin Drug Investig* 1998;15(1):37–43.
- Karunajeewa HA, Ilett KF, Duffall K, Kemiki A, Bockarie M, Alpers MP, et al. Disposition of artesunate and dihydroartemisinin after administration of artesunate suppositories in children from Papua New Guinea with uncomplicated malaria. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(August (8)):2966–72.
- Krishna S, Ganapathi S, Ster IC, Saeed MEM, Cowan M, Finlayson C, et al. A randomised, double blind, placebo-controlled pilot study of oral artesunate therapy for colorectal cancer. *EBioMedicine* 2015;2(January (1)):82–90.
- Krishna S, Planche T, Agbenyega T, Woodrow C, Agranoff D, Bedu-Addo G, et al. Bioavailability and preliminary clinical efficacy of intrarectal artesunate in Ghanaian children with moderate malaria. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(February (2)):509–16.
- Krudsood S, Loareesuwan S, Tangpukdee N, Wilairatana P, Phumratanaprapin W, Leowattana W, et al. New fixed-dose artesunate-mefloquine formulation against multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* in adults: a comparative phase IIb safety and pharmacokinetic study with standard-dose nonfixed artesunate plus mefloquine. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54(September (9)):3730–7.
- Kyaw MP, Nyunt MH, Chit K, Aye MM, Aye KH, Aye MM, et al. Reduced susceptibility of *Plasmodium falciparum* to artesunate in southern Myanmar. *PLoS One* 2013;8(3):e57689.
- Li Q, Cantilena IR, Leary KJ, Saviolakis GA, Miller RS, Melendez V, et al. Pharmacokinetic profiles of artesunate after single intravenous doses at 0.5, 1, 2, 4, and 8 mg/kg in healthy volunteers: a phase I study. *Am J Trop Med Hyg* 2009;81(October (4)):615–21.
- Li Q, Remich S, Miller SR, Ogutu B, Otieno W, Melendez V, et al. Pharmacokinetic evaluation of intravenous artesunate in adults with uncomplicated falciparum malaria in Kenya: a phase II study. *Malar J* 2014;13(July):281.
- Lindegardh N, Hanpithakpong W, Kamani kom B, Singhasonon P, Socheat D, Yi P, et al. Major pitfalls in the measurement of artemisinin derivatives in plasma in clinical studies. *J Chromatogr B* 2008;876(December (1)):54–60.
- Liu Y, Hu C, Liu G, Jia J, Yu C, Zhu J, et al. A replicate designed bioequivalence study to compare two fixed-dose combination products of artesunate and amodiaquine in healthy Chinese volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58(October (10)):6009–15.
- Lubell Y, Dondorp A, Guérin PJ, Drake T, Meek S, Ashley E, et al. Artemisinin resistance—modelling the potential human and economic costs. *Malar J* 2014;13(November):452.
- Matar KM, Awad AI, Elamin SB. Pharmacokinetics of artesunate alone and in combination with sulfadoxine/pyrimethamine in healthy Sudanese volunteers. *Am J Trop Med Hyg* 2014;90(June (6)):1087–93.
- McGready R, Phyo AP, Rijken MJ, Tarning J, Lindegardh N, Hanpithakpong W, et al. Artesunate/dihydroartemisinin pharmacokinetics in acute falciparum malaria in pregnancy: absorption, bioavailability, disposition and disease effects: ARS and DHA pharmacokinetics in pregnancy. *Br J Clin Pharmacol* 2012;73(March (3)):467–77.
- Meshnick SR, Taylor TE, Kamchonwongpaisan S. Artemisinin and the antimalarial endoperoxides: from herbal remedy to targeted chemotherapy. *Microbiol Rev* 1996;60(2):301–15.
- Metzger WG, Magris M, Vivas-Martinez S, Giron A, Brooms JD, Villalobos N, et al. High dose artesunate in combination with mefloquine: pharmacovigilance in the Venezuelan Amazon. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2012;106(March (3)):196–8.
- Miller AK, Bandyopadhyay N, Wootton DG, Duparc S, Kirby PL, Winstanley PA, et al. Pharmacokinetics of chlorproguanil, dapsone, artesunate and their major metabolites in patients during treatment of acute uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Eur J Clin Pharmacol* 2009;65(October (10)):977–87.
- Miller R, Li Q, Cantilena IR, Leary KJ, Saviolakis GA, Melendez V, et al. Pharmacokinetic profiles of artesunate following multiple intravenous doses of 2, 4, and 8 mg/kg in healthy volunteers: phase 1b study. *Malar J* 2012;11(1):255.
- Morris CA, Duparc S, Borghini-Pührer I, Jung D, Shi C-S, Fleckenstein L. Review of the clinical pharmacokinetics of artesunate and its active metabolite dihydroartemisinin following intravenous, intramuscular, oral or rectal administration. *Malar J* 2011a;10(September):263.
- Morris CA, Lopez-Lazaro L, Jung D, Methaneethorn J, Duparc S, Borghini-Pührer I, et al. Drug-drug interaction analysis of pyronaridine/artesunate and ritonavir in healthy volunteers. *Am J Trop Med Hyg* 2012;86(March (3)):489–95.
- Morris CA, Onyamboko MA, Capparelli E, Koch MA, Atibu J, Lokomba V, et al. Population pharmacokinetics of artesunate and dihydroartemisinin in pregnant and non-pregnant women with malaria. *Malar J* 2011b;10(1):114.
- Mwesigwa J, Parikh S, McGee B, German P, Drysdale T, Kahyango JN, et al. Pharmacokinetics of artemether-lumefantrine and artesunate-amodiaquine in children in Kampala, Uganda. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54(January (1)):52–9.
- Na-Bangchang K, Karbwang J, Congpoung K, Thanavibul A, Ubalee R. Pharmacokinetic and bioequivalence evaluation of two generic formulations of oral artesunate. *Eur J Clin Pharmacol* 1998;53(January (5)):375–6.
- Na-Bangchang K, Krudsood S, Silachamroon U, Molunto P, Tansan O, Chalermrut K, et al. The pharmacokinetics of oral dihydroartemisinin and artesunate in healthy Thai volunteers. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2004;35(September (3)):575–82.
- Navaratnam V, Mansor SM, Mordi MN, Akbar A, Abdullah MN. Comparative pharmacokinetic study of oral and rectal formulations of artesunate acid in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 1998;54(July (5)):411–4.
- Navaratnam V, Ramanathan S, Wahab MSA, Siew Hua G, Mansor SM, Kiechel J-R, et al. Tolerability and pharmacokinetics of non-fixed and fixed combinations of artesunate and amodiaquine in Malaysian healthy normal volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 2009;65(August (8)):809–21.
- Nealon C, Dzeing A, Muller-Romer U, Planche T, Sinou V, Kombila M, et al. Intramuscular bioavailability and clinical efficacy of artesunate in Gabonese children with severe malaria. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46(December (12)):3933–9.
- Newton PN, Barnes KI, Smith PJ, Evans AC, Chierakul W, Ruangveerayuth R, et al. The pharmacokinetics of intravenous artesunate in adults with severe falciparum malaria. *Eur J Clin Pharmacol* 2006;62(November (12)):1003–9.
- Onyamboko MA, Meshnick SR, Fleckenstein L, Koch MA, Atibu J, Lokomba V, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of artesunate and dihydroartemisinin following oral treatment in pregnant women with asymptomatic *Plasmodium falciparum* infections in Kinshasa DRC. *Malar J* 2011;10(1):49.
- Orrell C, Little F, Smith P, Folb P, Taylor W, Olliaro P, et al. Pharmacokinetics and tolerability of artesunate and amodiaquine alone and in combination in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 2008;64(July (7)):683–90.
- Ouji M, Augereau J-M, Paloque L, Benoit-Vical E. *Plasmodium falciparum* resistance to artemisinin-based combination therapies: a sword of Damocles in the path toward malaria elimination. *Parasite Paris* 2018;25:24.
- Pariante G, Leibson T, Carls A, Adams-Webber T, Ito S, Koren G. Pregnancy-associated changes in pharmacokinetics: a systematic review. *PLoS Med* 2016;13(November (11)):e1002160.
- Picot S. The other face of artesunate: southern drug to treat northern diseases. *EBioMedicine* 2015;2(January (1)):17–8.
- Ramharter M, Kurth F, Schreier AC, Nemeth J, von Glasenapp I, Bèlard S, et al. Fixed-dose pyronaridine-artesunate combination for treatment of uncomplicated falciparum malaria in pediatric patients in Gabon. *J Infect Dis* 2008;15(September (6)):911–9.
- Ramharter M, Kurth FM, Bèlard S, Bouyou-Akotet MK, Mamfoumbi MM, Agnandji ST, et al. Pharmacokinetics of two paediatric artesunate mefloquine drug formulations in the treatment of uncomplicated falciparum malaria in Gabon. *J Antimicrob Chemother* 2007;60(November (5)):1091–6.
- Rattanapunya S, Cressey TR, Rueangweerayut R, Tawon Y, Kongjam P, Na-Bangchang K. Pharmacokinetic interactions between artesunate-mefloquine and ritonavir-boosted lopinavir in healthy Thai adults. *Malar J* 2015;14(October):400.
- Roussel C, Caumes E, Thellier M, Ndour PA, Buffet PA, Jauréguiberry S. Artesunate to treat severe malaria in travellers: review of efficacy and safety and practical implications. *J Travel Med* 2017;24(March (2)).
- Sahr F, Willoughby VR, Bakima AA, Bockarie MJ. Apparent drug failure following artesunate treatment of *Plasmodium falciparum* malaria in Freetown, Sierra Leone: four case reports. *Ann Trop Med Parasitol* 2001;95(July (5)):445–9.
- Saunders D, Khemawoot P, Vanachayangkul P, Siripokasupkul R, Bethell D, Tyner S, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral artesunate monotherapy in patients with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Western Cambodia. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56(November (11)):5484–93.
- Simpson JA, Agbenyega T, Barnes KI, Di Perri G, Folb P, Gomes M, et al. Population pharmacokinetics of artesunate and dihydroartemisinin following intra-rectal dosing of artesunate in malaria patients. *PLoS Med* 2006;3(November (11)):e444.
- Sinou V, Malaika LTM, Taudon N, Lwango R, Alegre SS, Bertainx L, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a new ACT formulation: artesunate/amodiaquine (TRIMALACT) following oral administration in African malaria patients. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 2009;34(September (3–4)):133–42.
- Sirivichayakul C, Sabchareon A, Pengsaa K, Thairaporn I, Chaivisuth A, Na-Bangchang K, et al. Comparative study of the effectiveness and pharmacokinetics of two rectal artesunate/oral mefloquine combination regimens for the treatment of uncomplicated childhood falciparum malaria. *Ann Trop Paediatr* 2007;27(March (1)):17–24.
- Stepniowska K, Taylor W, Sirima SB, Ouedraogo EB, Ouedraogo A, Gansané A, et al. Population pharmacokinetics of artesunate and amodiaquine in African children. *Malar J* 2009;8(1):200.
- Tan B, Naik H, Jangl J, Yu K-S, Kirsch LE, Shi C-S, et al. Population pharmacokinetics of artesunate and dihydroartemisinin following single- and multiple-dosing of oral artesunate in healthy subjects. *Malar J* 2009;8(1):304.

- Teja-Isavadharm P, Watt G, Eamsila C, Jongsakul K, Li Q, Keeratithakul G, et al. Comparative pharmacokinetics and effect kinetics of orally administered artesunate in healthy volunteers and patients with uncomplicated falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2001;65(December (6)):717–21.
- Valea I, Tinto H, Traore/Coulibaly M, Toe LC, Lindegardh N, Tarning J, et al. Pharmacokinetics of co-formulated mefloquine and artesunate in pregnant and non-pregnant women with uncomplicated *Plasmodium falciparum* infection in Burkina Faso. *J Antimicrob Chemother* 2014;69(September (9)):2489–507.
- Walimbwa SI, Lamorde M, Waitt C, Kaboggoza J, Else I, Byakika-Kibwika P, et al. Drug interactions between dolutegravir and artemether-lumefantrine or artesunate-amodiaquine. *Antimicrob Agents Chemother* 2018;63(November (2)):1310–8.
- Wang J, Xu C, Liao FL, Jiang T, Krishna S, Tu Y. A temporizing solution to “Artemisinin Resistance”. *N Engl J Med* 2019;380(May (22)):2087–9.
- World Health Organization. World malaria report 2018 Geneva. 2018.
- Zhang S, Hai T, Brett K, Huang D, Davis T, Ashton M. Multiple dose study of interactions between artesunate and artemisinin in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 2001;52(October (4)):377–85.

3) [Article 2 : «Assessment of quantitative and semi-quantitative methods of artesunate biological \*in vitro\* test »](#)

*Article soumis dans PARASITE (en cours de relecture)*

Yobouet Ines Kouakou, Roukayatou Omorou, Ibrahim Bin Said, Adeline Lavoignat, Guillaume Bonnot, Anne-Lise Bienvenu\*, and Stephane Picot\*

\*Joint last author

**ICBMS CNRS 5246, SMITH, Malaria Research Unit, Campus Lyon-Tech La Doua, Lyon University, Lyon, France** (YI Kouakou PharmD, R Omorou, I Bin Said, A Lavoignat MSc, G Bonnot MSc, A-L Bienvenu PharmD, Prof S Picot MD); **Groupement Hospitalier Nord, Service Pharmacie, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France** (A-L Bienvenu PharmD); **and Groupement Hospitalier Nord, Institut de Parasitologie et Mycologie Médicale, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France** (YI Kouakou PharmD, Prof S Picot MD).

**Correspondence to:**

Yobouet Ines Kouakou, **ICBMS CNRS 5246, SMITH, Malaria Research Unit, Campus Lyon-Tech La Doua, Lyon University, Lyon, France**

1 Rue Victor Grignard, 69100, Lyon, France

ines.kouakou@hotmail.fr

+33 (0)6 46 22 56 85

**Abstract**

Artesunate is the current most potent antimalarial drug widely used for the treatment of malaria. Considering the emergence of artemisinin resistance, several situations may require a simple method for artesunate quantification. We thus developed two biological methods for artesunate evaluation in liquids, including quantitative and semi-quantitative methods. They were based on the measurement of samples' antimalarial activity on *Plasmodium falciparum* 3D7 culture using a modified Sybr green-I drug susceptibility test. For the quantitative method, we established a standard curve that resulted from a dose – response curve and evaluated its performance using quality controls. Whereas the standard curve regression analysis showed promising results (linearity range 1.5 – 24.6 ng/ml,  $r^2 = 0.9373$ ), we found that artesunate content of the controls was overestimated by more than 1.5 times. For the semi-quantitative



method, we used samples from permeation studies and compared their antimalarial activities to a reference represented by artesunate IC<sub>50</sub>. We demonstrated that antimalarial activities of permeation samples using artesunate as a powder were greater than the samples using artesunate as a solution. Artesunate bioassays can be simple techniques to assess artesunate in liquids, particularly in resources-limited setting. Comparison with reference methods is still recommended when an accurate drug quantification is required.

## Keywords

Artesunate, malaria, bioassay, quantitative test, semi-quantitative test

Évaluation d'une méthode quantitative et d'une méthode semi-quantitative de test biologique *in vitro* de l'artésunate

## Résumé

L'artésunate est actuellement le plus puissant médicament antipaludique largement utilisé pour le traitement du paludisme. Du fait de l'émergence de résistances aux dérivés de l'artémisinine, plusieurs situations pourraient nécessiter une méthode simple de dosage de l'artésunate. Nous avons donc développé deux méthodes biologiques pour l'analyse d'échantillons liquides d'artésunate, quantitative et semi-quantitative. Elles sont basées sur la mesure de l'activité antipaludique d'échantillons sur culture de *Plasmodium falciparum* 3D7 obtenue en utilisant une version modifiée du test de chimio-susceptibilité Sybr Green-I. Pour la méthode quantitative, nous avons obtenu une courbe d'étalonnage à partir d'une courbe dose – réponse et évalué ses performances en utilisant des contrôles qualités. Bien que l'analyse par régression linéaire de la courbe d'étalonnage ait généré des résultats prometteurs (intervalle de linéarité 1,5 – 24,6 ng/ml,  $r^2 = 0,9373$ ), nous avons constaté que la teneur en artésunate des contrôles qualité était surestimée de plus de 1,5 fois. Pour la méthode semi-quantitative, nous avons comparé les effets antipaludiques d'échantillons collectés lors d'études de perméabilité à celui d'une référence de concentration égale à la CI<sub>50</sub> de l'artésunate. Nous avons démontré que les activités antipaludiques d'échantillons de tests de perméation utilisant l'artésunate en poudre étaient plus importantes que celles de tests utilisant l'artésunate en solution. Les tests biologiques de l'artésunate peuvent être des méthodes simples pour l'analyse d'échantillons liquides d'artésunate, en particulier dans un contexte de ressources limitées. La comparaison



avec des méthodes de référence est toujours recommandée dès lors qu'une quantification précise du médicament est requise.

## Introduction

Malaria is a catastrophe for humanity. Despite several international programs, the disease still kills more than 400,000 people each year, most of them being children from developing countries [27]. Moreover, progresses in malaria management have been stalling for the last few years. This observation is even more alarming as resistance towards artemisinin derivatives, the current most potent antimalarial drugs, is emerging and taking roots in several endemic regions of the world [6,15,27].

Artesunate, a semisynthetic derivative of artemisinin, is the first line treatment for severe malaria when administered intravenously [27]. It can also be used orally in combination with long lasting antimalarial drugs like piperazine or lumefantrine for the treatment of uncomplicated malaria [5,23,27]. The widespread use of artesunate for the treatment of severe or uncomplicated malaria raises the need for therapeutic drug monitoring (TDM) [1]. Although artesunate quantification is not a priority in terms of patient management, several situations may require the availability of a simple method for artesunate quantification in liquids.

Developing a method for artesunate quantification has multiple shortcomings. First, artesunate is poorly soluble and readily hydrolyses in dihydroartemisinin (DHA) in aqueous acidic and neutral media. Second, methods for artesunate quantification including UV-VIS spectrophotometric [9,20], High Performance Liquid Chromatography (HPLC) [12,13,17,18], and liquid Chromatography with Mass Spectrometry detection (LC-MS or LC-MS/MS)[3,4,7,23] were previously described, but they are costly and difficult to implement in malaria endemic regions. Whereas attempts were made to develop low-cost methods such as Lateral Flow immunoassay (LFIA)[10] and Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)[11], they are still difficult to implement in resource-limited countries. In this context, a bioassay based on antimalarial activity measurement appears as a suitable method for artesunate quantification in various samples. Bioassays expressed in DHA concentrations equivalents were previously described, but they were based on the microdilution radioisotope method for susceptibility test[14,21,22].

The purpose of our study was to develop a biological method for artesunate quantification in liquids based on the measurement of their antimalarial activity on *Plasmodium falciparum* (Pf) culture. Following previous published results, a quantitative and a semi-quantitative method,

were developed based on the Sybr Green-I detection for *in vitro* drug susceptibility assay of *Pf* [2]. The semi-quantitative method was used for artesunate quantification in samples collected along an *in vitro* permeation test.

## **Material and Methods**

### **Chemicals and artesunate dilutions**

Artesunate (Chemical Abstract Service CAS number: 88495-63-0; IPCA #19003AS6RII [1 kg]) was purchased from IPCA Laboratories Limited (Mumbai, India) through Hepartex (Saint-Cloud, France). All other reagents were provided by Sigma-Aldrich Merck (Saint-Louis, Missouri, USA) and Thermofischer Scientific (Waltham, Massachusetts, USA). Krebs ringer buffer (KRB) was prepared by dissolving 6.8 g NaCl, 0.4 g KCl, 0.14 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 2.1 g NaHCO<sub>3</sub>, 3.575 g HEPES, 1.0 g D-glucose, 0.2 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, and 0.26 g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O in 1L of sterile distilled water [8]. Artesunate stock solution (1.28 mM) was prepared by dissolving drug powder into pure ethanol and stored at -20°C.

For the quantitative test, final tested artesunate dilutions into culture medium ranged from 512 to 0.25 nM. Quality controls of 15 (Q1) and 30 (Q2) nM of artesunate were prepared in culture medium for each test and tested in triplicate during two *in vitro* quantitative tests.

For the semi-quantitative test, artesunate dilutions and permeation assays samples were distributed in triplicate at 25 µl per well into 96-well culture plates. The plates were left to dry overnight at room temperature in sterile conditions, sealed with adhesive plastic and stored at +4°C until use[25]. Final tested artesunate concentrations ranged from 128 to 0.5 nM.

### ***Plasmodium falciparum* 3D7 culture**

*Plasmodium falciparum* parasites were incubated at 37°C (5% CO<sub>2</sub>, humid atmosphere) into human O+ erythrocytes suspended in RPMI 1640 containing phenol red, 25 mM of HEPES, 2 mM of L-glutamine, 5 g/l of Albumax<sup>TM</sup>, 2.1 g/l of sodium bicarbonate, 0.025 g/l of hypoxanthine, and 20 µg/ml of gentamicin (haematocrit = 5%) [24]. Parasites were synchronized immediately before use. Parasitaemia was determined after microscopic examination of a Giemsa-stained thin blood smear.

### **Quantitative test**

The experimental method was based on the Sybr Green-I *in vitro* drug susceptibility assay [19] and the Ring-stage survival assay (RSA)[26]. Briefly, synchronised parasites were diluted to

obtain a 2% haematocrit and 0.5% parasitaemia suspension [28]. The first step of the assay was to mix 700 µl of culture suspension with 100 µl of each drug dilution before incubation for 20 hours (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, humid atmosphere). Thereafter, the tubes were centrifugated at 500×g for 3 minutes, 700 µl of the supernatant discarded, and the pellet washed with 1,4 ml of culture medium. The washing medium was discarded and replaced by 700 µl of fresh culture medium. The suspensions were distributed in triplicate into 96-well plates (200 µl per well) and incubated for 20 hours. After incubation, plates were frozen at -20°C for at least 24 hours or at -80°C for two hours until Sybr Green-I assay was performed.

### **Semi-quantitative test**

An aliquot of unsynchronized *Pf 3D7* culture was diluted to obtain a parasitaemia of 0.5% and a haematocrit of 2%. Two hundred microliters of this suspension were distributed per well into predosed microplates. The microplates were incubated for 40 hours (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, humid atmosphere) and then frozen at -20°C for at least 24 hours or -80°C for two hours until Sybr Green-I assay was performed.

### **Evaluation of samples from an *in vitro* permeation test**

Samples from a permeation test conducted during the simultaneous course of an independent study were evaluated using the semi-quantitative test. The permeation test of this study was designed to evaluate the artesunate permeability of nasal mucosa [2] and requiring solubilisation of artesunate in Krebs ringer buffer (KRB). Before testing artesunate samples diluted in KRB, the effect of KRB on *Pf* parasites was investigated. KRB dilutions in culture medium were mixed with *Pf* parasites (0.5% parasitaemia, 2% haematocrit, unsynchronized), incubated for 40 hours (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, humid atmosphere), then frozen at -80°C for at least two hours before Sybr Green-I assay. The final KRB concentrations were 0, 12.5, 25, 50 and 100% (v/v) leading to a significant increase in osmolarity of medium from 308 to 631 mOsm/L. Test were conducted in triplicate during two independent assays.

### **Statistical analysis**

All data management was performed using GraphPad Prism version 9.2.0 software[29]. Statistical analyses including Mann – Whitney test, nonlinear regression (four parameters, variable slope), simple linear regression, and regression slope test were performed with a significance threshold of 0.05.

### ***Quantitative test***

Parasites growth inhibition curve was obtained using nonlinear regression analysis. The linear portion of the curve was visually located by plotting the parasites growth (Fluorescence Unit = FU) against the  $\text{Log}_{10}$  artesunate concentration and analysed by simple linear regression. A regression slope test was performed to conclude on the linear relationship between artesunate concentration and parasites growth. The artesunate concentration of a quality control (Q) was calculated using the equation of the linear regression analysis.

### ***Semi-quantitative test***

Artesunate half maximum inhibitory concentrations ( $\text{IC}_{50}$ ) were calculated by non-linear regression analysis and presented as the mean  $\pm$  standard deviation (SD). Artesunate semi-quantitative test was performed by comparing antimalarial activity of samples from the permeation tests and antimalarial activity of artesunate at approximately its  $\text{IC}_{50}$ .

## **Results**

### **Quantitative test**

Quantitative tests performed in triplicate for each concentration were repeated nine times. A four-parameter nonlinear regression analysis was used to synthesize the data set and obtain a parasite growth inhibition curve with increasing artesunate concentrations (Figure 1). A linear relationship between parasite growth inhibition and artesunate concentration was demonstrated for concentrations ranging from 4 to 64 nM (1.5 – 24.6 ng/ml). The  $r^2$  of the linear curve was 0.9373 and its slope was significantly different from 0 (p-value = 0.0068). Artesunate concentrations calculated according to the linear curve were  $37.2 \pm 1.3$  nM for Q1 (theoretical concentration = 15 nM) and  $53.1 \pm 2.4$  nM for Q2 (theoretical concentration = 30 nM) (Figure 2).

### **Semi-quantitative test**

Semi-quantitative preliminary tests were repeated 10 times for the determination of artesunate  $\text{IC}_{50}$  within testing conditions and two times for the determination of KRB effect on *Pf* parasites. Using nonlinear regression analyses of the data set of each individual assay, artesunate  $\text{IC}_{50}$  was determined at  $4.5 \pm 0.9$  nM. We demonstrated that KRB significantly reduced *Pf* growth for concentrations above 12.5% (v/v) which was the highest concentration providing a non-toxic osmolarity (348 mOsm/L) (Figure 3a). Indeed, antimalarial effect of artesunate at 4 nM in KRB

(12.5%, v/v) was not statistically different from artesunate at 4 nM in culture medium (p-value = 0.0939) (Figure 3b). Artesunate at 4 nM (IC<sub>50</sub>) in culture medium was therefore used as the reference condition to evaluate antimalarial activity of samples from the permeation tests. To limit the impact of KRB, all samples were diluted in culture medium to final KRB concentration of 12.5% (v/v) before performing artesunate semi-quantitative test.

Antimalarial effects of samples from two different permeation tests were evaluated using the semi-quantitative test. For the first permeation test using artesunate formulated as a solution (SOL), the antimalarial effect of the reference condition on *Pf* was significantly higher than the samples collected at H1 to H4 (p-values = 0.0091) (Figure 4a). The drug concentrations in those samples were therefore lower than artesunate IC<sub>50</sub> (4 nM). For the second permeation test using artesunate as a powdered mixture (POWDER), the antimalarial effect of the reference condition was significantly lower than the effects the samples collected at H1 to H4 (p-values = 0.0091)(Figure 4b). Moreover, the fluorescence signals of the POWDER samples were similar to that of the Minimum Growth Control (MGC, parasite DNA signal before incubation). The drug concentrations in these samples were therefore higher than artesunate IC<sub>50</sub> and induced a total inhibition of parasites growth during the test.

## Discussion

Several previous attempts have been made to develop simple quantitative methods for artesunate dosage including immunoassays-based tests (LFIA, ELISA)[10,11,16]. While some of them showed good performances, they are still difficult to implement in resource-limited countries. In this context, we aimed to develop a simple quantitative method in liquids for artesunate based on the measurement of artesunate antimalarial activity. Based on previously published data, we modified the Sybr-green susceptibility assay to develop the quantitative test [2]. The RSA-based test conditions, namely the synchronisation of parasites and the washing step at mid incubation time, allowed the flattening of the sigmoidal curve and a wider linearity interval. We evaluated the performance of the method by using control solutions of artesunate. Despite the promising results of the linear regression analysis, we deplored an overestimation of artesunate content in the control solutions probably related to the variation in *Pf* growth rate during the test: concentrations of the control solutions calculated using the linear curve were indeed estimated to be more than 1.5 times higher than their theoretical values. To limit *Pf* growth rate variability and optimize the performances of this quantitative bioassay, we then

recommend to test in a single assay the standard curve and the samples. A similar bioassay using a modification of the microdilution radioisotope technique was previously developed [22]. It showed good performances considering the standard curves spanning over a large concentration interval (2.5 to 100 ng/ml,  $r^2 > 0.98$ ) and the strong correlation with HPLC. However, the method was only dedicated to serum and plasma and results were expressed as DHA concentration equivalents.

In this study, we also developed a semi-quantitative method to analyse artesunate samples. It aimed to compare the antimalarial activity of unknown samples to a reference which concentration approximated artesunate  $IC_{50}$ . The tested drug samples were collected during *in vitro* permeation assays measuring the diffusion of the drug across a semipermeable membrane from the donor to the receptor compartment filled with KRB [8]. All permeation samples were diluted in culture medium prior to the semi-quantitative test as we found KRB to reduce parasites growth for concentrations above 12.5% (v/v). This reduction of *Pf* growth was likely linked to the hypertonicity of these KRB dilutions. Results for semi-quantitative tests were obtained using a 4 nM artesunate solution in culture medium as reference. For the permeation test using artesunate formulated as a solution, the antimalarial activities of the samples were statistically lower than the reference antimalarial activity, whereas the antimalarial activities of the permeation samples using artesunate as a powder were statistically higher than the reference. We then concluded that artesunate as a powder had a better diffusion capacity across a semipermeable membrane compared to artesunate as a solution. This semi-quantitative method was demonstrated to be simple and useful for the comparison of antimalarial effects of various samples. We also identified the matrix of samples to be an important parameter in the test development. The evaluation of the matrix impact on the semi-quantitative test is then an essential prerequisite before implementing the test.

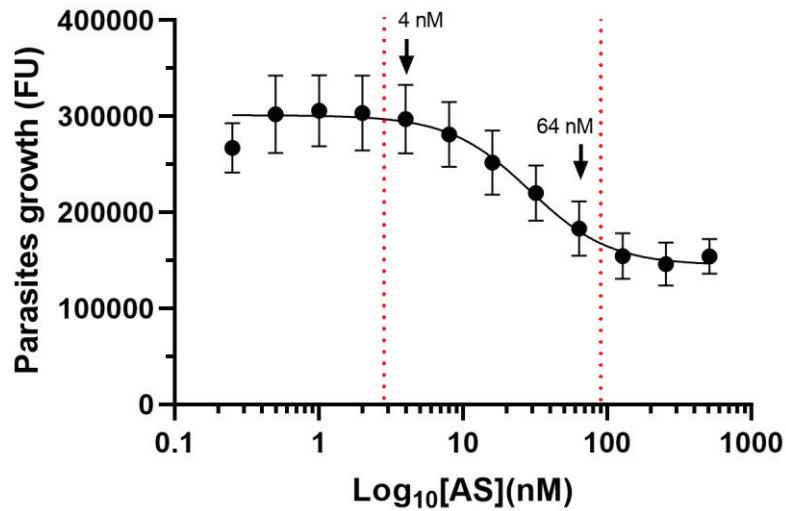
To conclude, the biological tests based on the measurement of antimalarial activity may be useful for evaluation of artesunate in various liquids, but comparison with reference methods including liquid chromatography with mass spectrometry detection is still recommended especially if the assay is used for a clinical purpose.

### **Acknowledgements**

Mr Eyad Almouazen for helpful discussions.

The authors have no competing interest to declare.

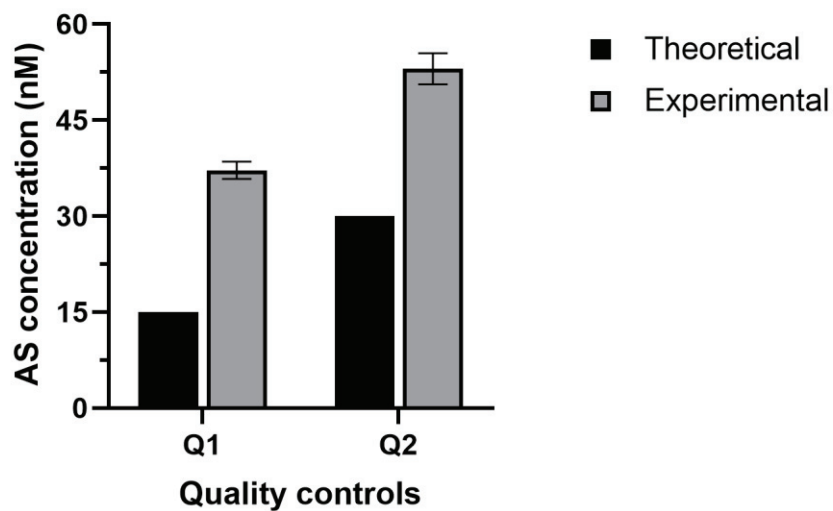
## Figures



**Figure 1. Parasites growth inhibition curve with artesunate concentration for the quantitative test**

This curve resulted from the analysis of data sets from nine independent assays using a four-parameter nonlinear regression. Each concentration was tested in triplicate in each independent assay. Abscissa axis was transformed into logarithm to the base 10 to better visualize the linear portion of the curve. Data are presented as the mean  $\pm$  SD ( $n \geq 9$ ).

FU = fluorescence unit; Log<sub>10</sub> = logarithm to the base 10; [AS] = artesunate concentration; nM = nanomolar; Red-dotted lines = indicate linearity interval.

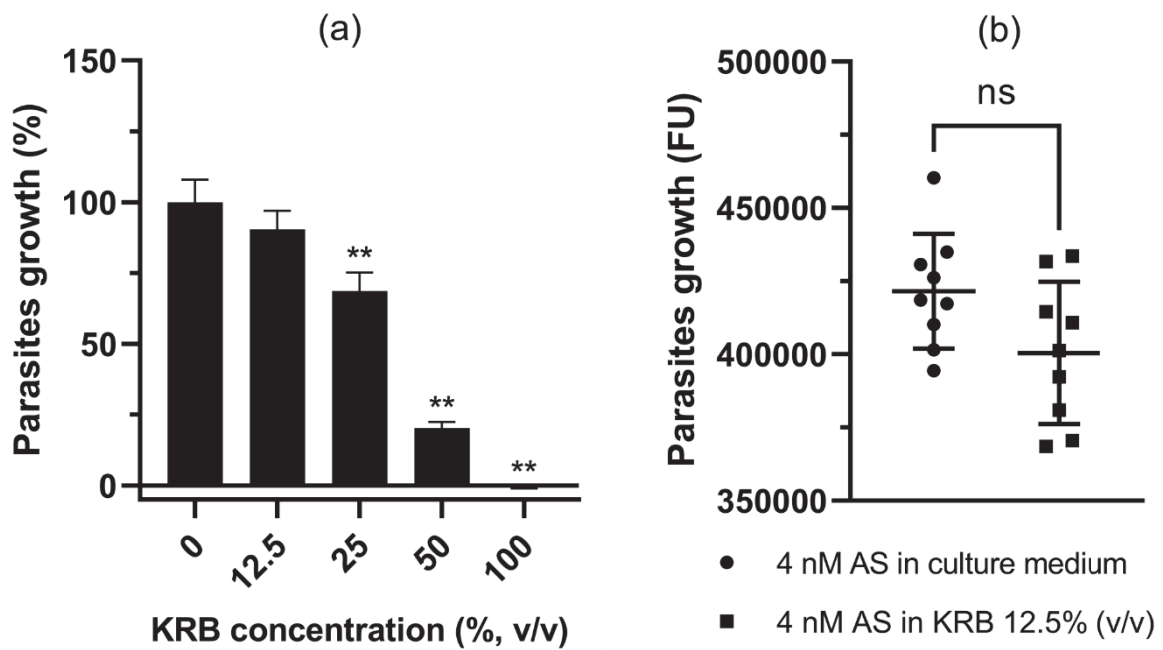


**Figure 2. Theoretical and experimental artesunate concentrations using the quantitative test**

Quality controls were tested in triplicate. The antimalarial activity of each control was used to calculate an experimental artesunate concentration using the standard curve. Experimental artesunate concentrations are presented as the mean  $\pm$  SD (n = 6).

AS = artesunate; nM = nanomolar.





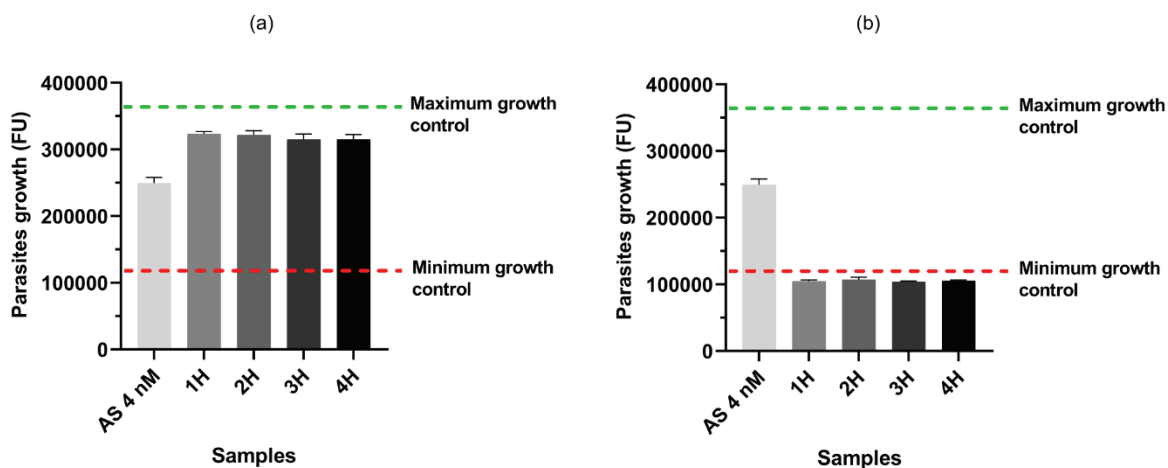
**Figure 3. (a) Impact of KRB on *Pf* growth and (b) antimalarial effect of artesunate at 4 nM prepared in culture medium or 12.5% KRB in culture medium for the semi-quantitative test**

KRB concentrations above 12.5% (v/v) significantly reduced parasites' growth. All samples containing KRB were therefore diluted into culture medium before use to limit its impact. Each concentration was tested in triplicate in two independent assays. Data are presented as the mean  $\pm$  SD (n = 6).

There was no statistical difference between the antimalarial activities of 4 nM artesunate solutions prepared in culture medium and 12.5% (v/v) KRB. Each sample was tested in triplicate in three independent assays. Data are presented as mean  $\pm$  SD (n = 9).

KRB = krebs ringer buffer; AS = artesunate; FU= fluorescence unit; ns: non-significant.

Statistical analyses were realised with GraphPad Prism software, Mann-Whitney test,  $\alpha = 5\%$ , p-value (\*\*)= 0.0022



**Figure 4. Antimalarial effect of the reference condition (AS 4 nM) and samples from (a) the permeation test using artesunate solution and (b) the permeation test using artesunate powder**

Each sample was tested in triplicate. Data are presented as mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ )

AS = artesunate; FU= fluorescence unit; Green dotted-line = threshold value for maximum parasite growth (fluorescence of parasites incubated without artesunate and KRB during the semi-quantitative test); Red dotted-line = threshold value form minimum parasite growth (parasite fluorescence at the beginning of the test).

## References

1. Bienvenu A-L, Djimdé A, Picot S. 2019. Antimalarial stewardship programs are urgently needed for malaria elimination: a perspective. *Parasite (Paris, France)*, 26, 16.
2. Bienvenu A-L, Ferrandiz J, Kaiser K, Latour C, Picot S. 2008. Artesunate–erythropoietin combination for murine cerebral malaria treatment. *Acta Tropica*, 106, 104–108.
3. Byakika-Kibwika P, Lamorde M, Mayito J, Nabukeera L, Mayanja-Kizza H, Katabira E, Hanpithakpong W, Obua C, Pakker N, Lindegardh N, Tarning J, Vries PJ de, Merry C. 2012. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous artesunate during severe malaria treatment in Ugandan adults. *Malaria Journal*, 11, 132.
4. Chinh NT, Quang NN, Anh CX, Thanh NX, Dai B, Birrell GW, Chavchich M, Edstein MD. 2011. Pharmacokinetics and Ex Vivo Antimalarial Activity of Artesunate-Azithromycin in Healthy Volunteers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55, 4412–4415.
5. Dondorp AM, Fanello CI, Hendriksen IC, Gomes E, Seni A, Chhaganlal KD, Bojang K, Olaosebikan R, Anunobi N, Maitland K, Kivaya E, Agbenyega T, Nguah SB, Evans J, Gesase S, Kahabuka C, Mtove G, Nadjm B, Deen J, Mwanga-Amumpaire J, Nansumba M, Karema C, Umulisa N, Uwimana A, Mokuolu OA, Adedoyin OT, Johnson WB, Tshefu AK, Onyamboko MA, Sakulthaew T, Ngum WP, Silamut K, Stepniewska K, Woodrow CJ, Bethell D, Wills B, Oneko M, Peto TE, Seidlein L von, Day NP, White NJ. 2010. Artesunate versus quinine in the treatment of severe falciparum malaria in African children (AQUAMAT): an open-label, randomised trial. *The Lancet*, 376, 1647–1657.
6. Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyto AP, Tarning J, Lwin KM, Ariey F, Hanpithakpong W, Lee SJ, Ringwald P, Silamut K, Imwong M, Chotivanich K, Lim P, Herdman T, An SS, Yeung S, Singhasivanon P, Day NPJ, Lindegardh N, Socheat D, White NJ. 2009. Artemisinin Resistance in Plasmodium falciparum Malaria. *The New England Journal of Medicine*, 361, 455–467.

7. Geditz MCK, Heinkele G, Ahmed A, Kreamsner PG, Kerb R, Schwab M, Hofmann U. 2014. LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of artesunate and its metabolites dihydroartemisinin and dihydroartemisinin glucuronide in human plasma. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406, 4299–4308.
8. Gonçalves VSS, Matias AA, Poejo J, Serra AT, Duarte CMM. 2016. Application of RPMI 2650 as a cell model to evaluate solid formulations for intranasal delivery of drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 515, 1–10.
9. Kalyankar TM, Kakade RB, Attar MS, Kamble AR. 2013. Simultaneous Spectrophotometric Estimation of Artesunate and Mefloquine. *Journal of Chemistry*, 2013, 1–5.
10. Kitisripanya T, Sermpradit W, Sakamoto S, Tanaka H, Putalun W. 2020. An estimated quantitative lateral flow immunoassay for determination of artesunate using monoclonal antibody. *Biomedical Chromatography*, 34, e4718.
11. Mitsui Y. 2016. Development of a simple and specific direct competitive ELISA for the determination of artesunate using an anti-artesunate polyclonal antiserum. *Tropical Medicine and Health*, 44, 37.
12. Navaratnam V, Ramanathan S, Wahab MSAb, Siew Hua G, Mansor SM, Kiechel J-R, Vaillant M, Taylor WRJ, Olliaro P. 2009. Tolerability and pharmacokinetics of non-fixed and fixed combinations of artesunate and amodiaquine in Malaysian healthy normal volunteers. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 65, 809–821.
13. Nealon C, Dzeing A, Muller-Romer U, Planche T, Sinou V, Kombila M, Kreamsner PG, Parzy D, Krishna S. 2002. Intramuscular Bioavailability and Clinical Efficacy of Artesunate in Gabonese Children with Severe Malaria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46, 3933–3939.
14. Newton P, Suputtamongkol Y, Teja-Isavadharm P, Pukrittayakamee S, Navaratnam V, Bates I, White N. 2000. Antimalarial Bioavailability and Disposition of Artesunate in Acute Falciparum Malaria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44, 972–977.

15. Ouji M, Augereau J-M, Paloque L, Benoit-Vical F. 2018. Plasmodium falciparum resistance to artemisinin-based combination therapies: A sword of Damocles in the path toward malaria elimination. *Parasite (Paris, France)*, 25, 24.
16. Qian J, He Q, Liu L, Wang M, Wang B, Cui L. 2020. Rapid quantification of artemisinin derivatives in antimalarial drugs with dipstick immunoassays. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 191, 113605.
17. Saeed MA, Ansari MT, Ch BA, Zaman M. 2020. RP-HPLC Method for the Determination and Quantification of Artesunate. *Journal of Chromatographic Science*, 58, 695–699.
18. Sinou V, Malaika TM, Taudon N, Lwango R, Alegre SS, Bertaux L, Sugnaux F, Parzy D, Benakis A. 2009. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a new ACT formulation: Artesunate/Amodiaquine (TRIMALACT®) following oral administration in African malaria patients. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 34, 133–142.
19. Smilkstein M, Sriwilaijaroen N, Kelly JX, Wilairat P, Riscoe M. 2004. Simple and Inexpensive Fluorescence-Based Technique for High-Throughput Antimalarial Drug Screening. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48, 1803–1806.
20. Sreevidya T, Narayana B. 2009. A Simple and Rapid Spectrophotometric Method for the Determination of Artesunate in Pharmaceuticals. *Eurasian J. Anal. Chem*, 4, 119–126.
21. Teja-Isavadharm P, Nosten F, Kyle DE, Luxemburger C, Kuile FT, Peggins JO, Brewer TG, White NJ. 1996. Comparative bioavailability of oral, rectal, and intramuscular artemether in healthy subjects: use of simultaneous measurement by high performance liquid chromatography and bioassay. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 42, 599–604.
22. Teja-Isavadharm P, Peggins JO, Brewer TG, White NJ, Webster HK, Kyle DE. 2004. Plasmodium falciparum-Based Bioassay for Measurement of Artemisinin Derivatives in Plasma or Serum. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48, 954–960.

23. Teja-Isavadharm P, Siriyanonda D, Siripokasupkul R, Apinan R, Chanarat N, Lim A, Wannaying S, Saunders D, Fukuda MM, Miller RS, Weina PJ, Meléndez V. 2010. A simplified liquid chromatography-mass spectrometry assay for artesunate and dihydroartemisinin, its metabolite, in human plasma. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 15, 8747–8768.
24. Trager W, Jensen JB. 1976. Human Malaria Parasites in Continuous Culture. *Science*, 193, 673–675.
25. Traore K, Lavoignat A, Bonnot G, Sow F, Bess GC, Chavant M, Gay F, Doumbo O, Picot S. 2015. Drying anti-malarial drugs in vitro tests to outsource SYBR green assays. *Malaria Journal*, 14, 90.
26. Witkowski B, Amaratunga C, Khim N, Sreng S, Chim P, Kim S, Lim P, Mao S, Sopha C, Sam B, Anderson JM, Duong S, Chuor CM, Taylor WRJ, Suon S, Mercereau-Puijalon O, Fairhurst RM, Menard D. 2013. Novel phenotypic assays for the detection of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: in-vitro and ex-vivo drug-response studies. *The Lancet. Infectious Diseases*, 13, 1043–1049.
27. World Health Organization. 2020. World malaria report 2020: 20 years of global progress and challenges. World Health Organization.
28. Zhang J, Li N, Siddiqui FA, Xu S, Geng J, Zhang J, He X, Zhao L, Pi L, Zhang Y, Li C, Chen X, Wu Y, Miao J, Cao Y, Cui L, Yang Z. 2019. In vitro susceptibility of *Plasmodium falciparum* isolates from the China-Myanmar border area to artemisinins and correlation with K13 mutations. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 10, 20–27.
29. 2021. GraphPad Prism. GraphPad Software: San Diego, California USA.

4) [Article 3: « An \*in vitro\* proof of concept study of a pre-referral nasal treatment for acute malaria »](#)

*Article en préparation pour soumission*

Yobouet Ines Kouakou, Aurelien Millet, Roukayatou Omorou, Ibrahim Bin Said, Adeline Lavoignat, Guillaume Bonnot, Anne-Lise Bienvenu\*, Stephane Picot\*

\*Joint last author

**ICBMS CNRS 5246, SMITH, Malaria Research Unit, Campus Lyon-Tech La Doua, Lyon University, Lyon, France** (YI Kouakou PharmD, R Omorou, I Bin Said, A Lavoignat MSc, G Bonnot MSc, A-L Bienvenu PharmD, Prof S Picot MD); **Groupement Hospitalier Nord, Institut de Parasitologie et Mycologie Médicale, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France** (YI Kouakou PharmD, Prof S Picot MD); **Groupement Hospitalier Nord, Service Pharmacie, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France** (A-L Bienvenu PharmD) and **Groupement Hospitalier Sud, Laboratoire de Pharmaco-Toxicologie, Hospices Civils de Lyon, Pierre-Bénite, France** (Aurelien Millet, PharmD)

Correspondence to:

Yobouet Inès Kouakou, **ICBMS CNRS 5246, SMITH, Malaria Research Unit, Campus Lyon-Tech La Doua, Lyon University, Lyon, France,**

2 Rue Victor Grignard, 69100, Lyon, France

[ines.kouakou@hotmail.fr](mailto:ines.kouakou@hotmail.fr)

[Phone +33 6 46 22 56 85](tel:+33646225685)

## Abstract

**Background:** Malaria kills mostly young children in rural endemic areas. Early treatment of mild cases is crucial to prevent severe cases and reduce malaria mortality and morbidity. In the event of severe symptoms with an unavailable oral route, the world health organization recommends the administration of artesunate suppositories as pre-referral treatment before transportation to the hospital. However, negative cultural perception of the rectal route as well as drug bioavailability variability among other limitations could impede the use of these suppositories. There is therefore a need for an alternate dosing route for malaria pre-referral treatment. The aim of this study was to assess the nasal mucosa as an alternative, safe, and accessible dosing route for malaria pre-referral treatment.

**Methods:** For that purpose, the permeability of artesunate in solution and powder formulations was studied in vitro on RPMI 2650 human nasal mucosa model. Drug toxicity was evaluated by MTT cytotoxicity tests on RPMI 2650 cells and by measuring the Transepithelial Electrical Resistance (TEER) of the model immediately before and after the permeation tests. Drug quantification was performed by Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry.

**Results:** Regarding the permeation tests,  $2.1 \pm 0.3 \%$  and  $26.8 \pm 6.6 \%$  ( $p = 0.0003$ ) of the initial artesunate dose permeated through the cell layers after 4-hours tests for the solution and powder formulations, respectively. TEER values of the model measured immediately after and 24 hours after the tests were not significantly different from the initial value.

**Conclusion:** Artesunate formulations showed no toxicity on the RPMI 2650 nasal mucosa model, but permeation was limited. Better permeation efficiency could be achievable by formulation optimization: using reversible permeation enhancers, for example, could improve drug permeation without added cell damage.

## Keywords

Severe Malaria; Artesunate; pre-referral treatment; nose-to-brain delivery; nasal mucosa; RPMI 2650



## Background

Malaria is one of the deadliest human infectious diseases, responsible for more than 400,000 deaths in 2019, most of them being young children in sub-Saharan Africa (1,2). Whereas a great majority of cases are uncomplicated and successfully treated with oral antimalarials, severe malaria may occur in non-immune patients, including children under five years old living in high transmission endemic regions and travellers from nonendemic regions (1,3–5). Considering severe malaria may be the result of a delayed or inadequate treatment (6), a rapid and optimal antimalarial treatment is critical to increase the chance of therapeutic success. It would also help to avoid complications, including cerebral malaria, the most frequent one in young children (3,19).

The first-line treatment recommended for severe malaria is intravenous artesunate, a semisynthetic derivative of artemisinin. In rural areas where intravenous treatments are not available, the World Health Organization (WHO) recommends the use of a pre-referral artesunate treatment before addressing the patient to the nearest hospital (1,7). Artesunate pre-referral treatment is a single dose of artesunate administered intrarectally to young children (< 6 years old) at risk of severe malaria when oral route is unavailable (1,7). Artesunate suppository at the time of referral was indeed demonstrated to reduce the risk of death or permanent disability (7). Among its advantages, the rectal route is non-invasive, usable in unconscious or vomiting patients, allows systemic drug absorption, and at least partial avoidance of the hepatic first-pass effect (8). However, expulsion of the suppository is still possible, erratic absorption of rectally administered drug is common in young infants, and negative cultural perception of the rectal route could limit its use (8–10). In this context, there is a need for the development of an alternative artesunate pre-referral treatment.

Intranasal route was described as an alternative to parenteral and oral routes (11). The advantages of the nasal route include non-invasiveness, ease of drug administration, and fast drug absorption (11,12). Among its shortcomings, are the short retention time of drugs because of mucociliary clearance, metabolic degradation in the nasal cavity, and restricted dosing volume, mostly in children (12–14). In the nasal cavity, the respiratory and the olfactory mucosa are of particular interest for drug absorption: the respiratory mucosa is the preferential site for systemic drug absorption (12,15,16), whereas the olfactory mucosa is the preferential site for nose-to-brain drug absorption (12,16). Artesunate intranasal administration for severe malaria treatment will then allow not only the systemic effects of artesunate, but also the nose-to-brain delivery of artesunate that will prevent cerebral malaria. This statement is based on preliminary

data obtained in a murine model of cerebral malaria that demonstrated the nasal route to prevent the development of complications including cerebral malaria (9). In this study, it was indeed demonstrated that dihydroartemisinin, the main metabolite of artesunate, was recovered into the brain of mice after artesunate intranasal treatment and that early artesunate treatment using intranasal route prevent the development of cerebral malaria.

In this context, there is an urgent need to conduct an in vitro proof of concept study in order to assess artesunate permeation and cytotoxicity using a model of human nasal mucosa. This would indeed contribute to the establishment of the nasal route as an alternative for pre-referral treatment of malaria.

## **Material and Methods**

### **Chemicals, culture media, and drug solutions**

Artesunate (Chemical Abstract Service CAS number: 88495-63-0; IPCA #19003AS6RII [1 kg]) was purchased from IPCA Laboratories Limited (Mumbai, India) through Hepartex (Saint-Cloud, France). Krebs-ringer buffer (KRB) was prepared by dissolving 6.8 g NaCl, 0.4 g KCl, 0.14 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 2.1 g NaHCO<sub>3</sub>, 3.575 g HEPES, 1.0 g D-glucose, 0.2 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, and 0.26 g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O in 1L of distilled sterile water. HEPES, D-glucose, and NaHCO<sub>3</sub>, were purchased from Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Germany). All other KRB reagents, 0.25% (w/v) trypsin-EDTA, Trypan blue stain (0.4%), phosphate buffer solution (PBS) tablets, fluorescein sodium salt (NaF), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), and Dimethyl sulfoxide (DMSO), were purchased from Sigma-Aldrich Merck (Saint-Louis, Missouri, USA). Culture medium included minimum essential medium (MEM), 10% (v/v) heat-inactivated sterile foetal bovine serum (FBS), 1% (w/v) L-Glutamine, 1% (v/v) non-essential amino-acids (NEAA), and 20 µg/ml gentamicin. MEM, heat-inactivated FBS, L-glutamine, and NEAA, were purchased from Sigma-Aldrich Merck (Saint-Louis, Missouri, USA). RPMI 2650 cells (RPMI 2650 ECACC 88031602) were purchased from the European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC, Porton, Wiltshire, England). Falcon® Cell-culture flasks, Flacon® 96-well plates and Corning Costar® 12-well plates were purchased from Corning (Glendale, Arizona, USA). ThinCert® tissue-culture inserts for 12-Well plates (polyethylene terephthalate membrane, 1.13 cm<sup>2</sup>, 0.4 mm pore size) were purchased from Greiner Bio-One (Kremsmünster, Austria). Artesunate and artesunate-d4 standards for mass spectrometry (MS) analysis were purchased from Alsachim (Illkirch-Graffenstaden, France). Ultrapure water and MS-grade acetonitrile were obtained from Biosolve (Dieuze, France).

Formic acid and ammonium formate were purchased from Sigma Aldrich (Saint-Louis, Missouri, USA).

Artesunate stock solutions (30 mg/ml) for permeation and MTT tests were prepared into a 5% (w/v) NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution followed by dilutions into adequate media. Artesunate for MTT assays was diluted into culture medium to final concentrations of 16, 12, 6, 3, 1.5, and 0.75 µg/ml. The donor for artesunate permeation studies was either a 0.75 µg/ml artesunate solution in KRB or a 20 µg/mg powder mixture of artesunate and corn-starch. The donor solution for NaF permeation tests was prepared by dissolving NaF into KRB (25 µg/ml). All molecules' solutions were filtered before use (0.22 µm filter).

### **Cell culture**

RPMI 2650 cells were used between passage 11 and 25 for all experiments. They were routinely cultured into 25 cm<sup>2</sup> polystyrene cell-culture flasks under standard conditions (humid atmosphere at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>). For cell passaging, cells were washed with PBS at 37°C and then detached with 0.25% (w/v) trypsin-EDTA at 37°C seven days after previous seeding. Cell viability was assessed using a standard trypan blue staining procedure. After counting, cells were seeded in a new flask at a 4×10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup> seeding density. Culture medium was changed every two to three days. Multilayer cell culture was performed into tissue-culture inserts according to the protocol previously described by Reich and Becker (17). Briefly, 2×10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup> were seeded on permeable ThinCert® insert membranes and cultured under liquid-covered conditions (LCC) for eight days. After this period, the inserts were lifted at the air-liquid interface (ALI) and cultured for 14 more days to allow the formation of multiple layers and tight junctions (17,18). Transepithelial electrical resistance (TEER) was measured every two to three days during ALI culture. Experiments were performed in triplicate during at least three independent assays.

### **Transepithelial electrical resistance (TEER) measurements**

TEER was measured using a Millicell® ERS-2 Voltohmmeter (Merck, Darmstadt, Germany) and the STX01 chopstick electrode according to manufacturer's instructions (Figure 1). Briefly, culture medium or KRB was added to the apical and basolateral compartments to final volumes of 1 ml and 1.5 ml, respectively. Cultures were then left to equilibrate at 37°C for 30 minutes before measurements. TEER readings were corrected by subtracting blank filters values and normalized to the surface area of the membrane (1.13 cm<sup>2</sup>). Cell cultures having TEER values of at least 60 Ω.cm<sup>2</sup> were used for permeation assays (19).

### **MTT cytotoxicity assay**

A MTT cytotoxicity assay was performed to assess artesunate cytotoxicity on RPMI 2650 cells (20,21). Briefly, RPMI 2650 cells were seeded at a density of  $1.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> in 96-well plates. After 24 hours, artesunate drug dilutions were added and cells were incubated for 24 hours. Following drug exposure, cells were gently washed twice with 100  $\mu$ l PBS at 37°C before adding a 5 mg/ml MTT in PBS solution. After four hours of incubation, MTT solution was discarded and 200  $\mu$ l of DMSO was added to each well. After one hour of incubation, absorbances were read at 485 nm using a Tristar2 LB 942 Multimode Microplate Reader (Berthold Technologies, Germany). Negative (cells without xenobiotics) and positive (cells with 25% v/v DMSO) controls were included. Results were expressed as cell viability (%) relative to negative control (100 % viability). According to ISO 10993-5:2009, artesunate dilutions with cell viability percentages above 80 % were considered as non-cytotoxic (22,23). Experiments were performed in triplicate during three independent assays.

### ***In vitro* permeation studies**

The permeation of the sodium salt of fluorescein (NaF) was used to validate the RPMI 2650 multilayer cell model. Before the permeation test, multilayer cultures were rinsed with preheated KRB (37°C) and their TEER were measured. In another 12-Well plate, 0.5 ml of donor solution was added into the donor chamber and 1.5 ml of KRB (37°C) in the receptor chamber. The plates were incubated for one hour under orbital shaking (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, humid atmosphere, 100 rpm). Samples (100  $\mu$ l) were collected from the receptor chamber at fixed time intervals and immediately replaced with fresh KRB (37°C). Permeated NaF was quantified into each sample using a Tristar2 LB 942 Multimode Microplate Reader (Berthold Technologies, Germany) with the excitation and emission wavelengths of 485 and 535, respectively. Experiments were performed with five replicates during two independent assays. The apparent permeability coefficient of NaF ( $P_{app}$ ) was calculated with the following Food and Drug Administration approved equation and expressed in cm/s (19):

$$P_{app} = \left( \frac{V \times C_f}{C_i \times A \times t} \right)$$

V: volume of the acceptor chamber (cm<sup>3</sup>); C<sub>f</sub>: drug concentration in the acceptor chamber at the end of the experiment (g/l or mol/l); C<sub>i</sub>: initial drug concentration in the donor chamber (g/l or mol/l); A: surface area of the membrane (cm<sup>2</sup>); t: duration of the experiment (s).

Artesunate permeation was evaluated in a similar way as described above for NaF. Aliquots of 0.5 ml of artesunate solution (0.75  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) or 10 mg of artesunate powder (20  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) were added into the donor chamber. Each permeation test lasted for 4 hours and 200  $\mu\text{l}$  samples were regularly collected from the acceptor chamber. TEER measurements were performed immediately before ( $\text{TEER}_i$ ), after ( $\text{TEER}_{4\text{h}}$ ), and 24 hours after ( $\text{TEER}_{24\text{h}}$ ) test initiation. Artesunate permeation tests were performed in triplicate during three independent tests.

### **Analytical method**

Quantification of artesunate was performed with an ultra-high performance liquid chromatography (Acquity<sup>TM</sup>, Waters®, Milford, MA, USA) coupled to a tandem mass spectrometer (XEVO-TQ-MS, Waters). Chromatographic separation was performed using an Ethylene Bridged Hybrid (BEH) C18 column (1.7  $\mu\text{m}$ , 2.1 x 100 mm, Waters®). The mobile phase consisted of 10 mM ammonium formiate in water (pH = 3) and 0.1% (v/v) formic acid in acetonitrile. Calibrators were prepared in KRB at concentrations ranging from 0.5 to 25 000 ng/ml. Before quantification, 20  $\mu\text{L}$  of acetonitrile containing artesunate-d4 internal standard (at a concentration of 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) were added to 180  $\mu\text{L}$  of each sample.

### **Statistical analysis**

All data management was performed with Microsoft Office Excel and GraphPad Prism 9.2.0 software.

Statistical analyses, including one sample Wilcoxon tests and Mann-Whitney tests were performed with the significance threshold of  $\alpha = 0.05$ . Data are presented as the mean  $\pm$  standard deviation (SD) of at least three replicates.

## **Results**

### **Validation of the RPMI 2650 culture model for *in vitro* permeation tests**

RPMI 2650 cells were successively cultured under LCC and ALI conditions for 8 days and 14 days, respectively, to obtain appropriate cultures for *in vitro* drugs permeation tests. Monitoring of TEER values during ALI culture and determination of the  $P_{\text{app}}$  of NaF, a low weight hydrophilic marker of paracellular permeation, were used for the validation of the culture model. Average TEER values increased from  $23 \pm 4 \Omega \cdot \text{cm}^2$  to  $63 \pm 4 \Omega \cdot \text{cm}^2$  from the beginning to the end of ALI culture and demonstrated the gradual formation of tight junctions (figure 2). The  $P_{\text{app}}$  of NaF was  $1.79 \pm 0.07 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ .

### **Effect of artesunate solution on RPMI 2650 cell viability**

MTT assay was performed to determine the effect of artesunate on RPMI 2650 cells viability. Cells were incubated with increasing artesunate concentrations for 24 hours. Cell viability decreased from  $85 \pm 1\%$  to  $10 \pm 4\%$  upon treatment with artesunate concentrations ranging from 0.75 to 16  $\mu\text{g/ml}$  (figure 3). Reduction in cell viability was significant when artesunate concentration was greater than 1.5  $\mu\text{g/ml}$  ( $p\text{-value} = 0.0313$ ). The permeation tests using artesunate solution as donor were performed with a donor at a concentration of 0.75  $\mu\text{g/ml}$  as it met the required non-cytotoxicity criterium (cell viability  $> 80\%$ ).

### **Artesunate permeation studies**

The permeation profiles of artesunate on the RPMI 2650 model are presented in figure 4. The powder formulation demonstrated a better permeation efficiency ( $26.8 \pm 6.6\%$ ) than the solution formulation ( $2.1 \pm 0.3\%$ ) after four hours of test ( $p = 0.0003$ ). Of note, the TEER values before the permeation tests were not significantly different from the values measured after the tests (figure 5). For the tests using artesunate solution as donor, TEER values were  $90 \pm 8 \Omega\cdot\text{cm}^2$ ,  $98 \pm 16 \Omega\cdot\text{cm}^2$  ( $p = 0.3740$ ), and  $88 \pm 12 \Omega\cdot\text{cm}^2$  ( $p = 0.8791$ ) before, immediately after and 24 hours after the tests, respectively. For the tests using artesunate powder, they were  $81 \pm 10 \Omega\cdot\text{cm}^2$ ,  $90 \pm 15 \Omega\cdot\text{cm}^2$  ( $p = 0.2859$ ), and  $71 \pm 8 \Omega\cdot\text{cm}^2$  ( $p = 0.0882$ ).

### **Discussion**

The objectives of this *in vitro* proof of concept study were to investigate the cytotoxicity and the permeation of artesunate formulations on the RPMI 2650 human nasal mucosa model. The *in vitro* model used in this study was proven to mimic the human nasal mucosa (24). TEER values of this model, which measure tissue integrity and tightness, were demonstrated to be similar to that of the excised human nasal mucosa ( $75 - 180 \Omega\cdot\text{cm}^2$ ) (25–28). Moreover, the distribution of adherent and tight junction proteins, including E-cadherin and zonula occludens-1, as well as the expression of ABC efflux pumps, was shown to be similar to a leaky epithelium (19,29). Some studies even demonstrated the formation of a mucoid material on the apical surface of the cells during ALI culture (18,30).

The first step of our study was to validate the RPMI 2650 model by assessing its barrier function using TEER measurements. The TEER values obtained at the end of ALI culture were similar to those previously reported ( $66$  to  $79 \pm 5 \Omega\cdot\text{cm}^2$ )(18,29). Moreover, the average



apparent permeability coefficient of NaF was in agreement with data reported from the same model(17) or from excised human nasal mucosa ( $3.12 \times 10^{-6} \pm 1.99 \times 10^{-6}$  cm/s)(31). Then, the agreement of our results with previous published data allowed us to validate the RPMI 2650 model.

The second step was to perform artesunate permeation assays using the *in vitro* model. Before the permeation assays, artesunate cytotoxicity on RPMI 2650 cells was assessed using a MTT assay after a 24-hour drug exposure. Artesunate was cytotoxic for concentrations greater than 0.75 µg/ml. One possible explanation for artesunate cytotoxicity was that the RPMI 2650 cell line originates from an anaplastic carcinoma of human nasal septum (29,32) and that artesunate has an antitumoral activity described on several *in vitro* models of cancer, including leukaemia, melanoma, oesophageal, and lung cancers (33). The cleavage of artesunate endoperoxide bridge is believed to induce an oxidative stress responsible for DNA damage, apoptosis, autophagy, ferroptosis, and inhibition of angiogenesis (33). In the light of these results, permeation tests were performed with 0.75 µg/ml artesunate solutions as average cell viability for this concentration was above 80%. Moreover, considering artesunate potential cytotoxicity on the RPMI 2650 multilayer model, TEER was measured before and after both types of permeation assays to assess the integrity of the model. This allowed to demonstrate that artesunate formulations tested during the permeation assays did not alter the integrity of the model.

Artesunate permeation tests were performed using either a solution or a powder as donor formulations. A higher permeation efficiency was demonstrated for artesunate formulated as a powder compared to a solution ( $p = 0.0003$ ). This result may be explained by the higher drug concentration on the cell interface for the powder compared to the solution, as previously reported (18,34,35). Indeed, the higher drug concentration gradient increases the concentration-dependant passive diffusion of the drug through inter- and intracellular pathways (34). Of note, artesunate formulation as a powder offers a great advantage over solution. Artesunate is indeed readily hydrolysed in its active metabolite, dihydroartemisinin (DHA) under aqueous conditions (36). The development of artesunate anhydrous powder formulations would therefore prevent the chemical degradation of artesunate and increase the shelf life of the medication. Another possible explanation for the lower permeation efficiency of artesunate solution compared to artesunate powder was that artesunate was hydrolysed in DHA, thus the concentration-dependant passive diffusion was reduced. The greater permeation efficient of the powder formulation was also demonstrated by sample assessment using a semi-quantitative biological test. Samples collected along a test using artesunate powder as donor demonstrated

greater antimalarial activities on parasites cultures than samples from test using artesunate solution as donor. These results will be published in a separate paper.

Considering artesunate *in vitro* permeation efficiency, it might be possible to optimise *in vivo* bioavailability of the drug using other formulations such as Nanostructured Lipid Carriers (NLCs) (40). *In vitro* assessment of NLCs showed promising results, including optimal diameter of the NLCs for brain targeting ( $\leq 100$  nm), good formulation stability ( $\geq 3$  months), osmolarity and pH in the acceptable ranges for nasal drug delivery, and a greater residency time inside the nasal cavity compared to the solution.

## **Conclusion**

This *in vitro* proof-of-concept study completes the results previously obtained in a murine model of cerebral malaria successfully treated with intranasal artesunate. This *in vitro* study support indeed the potential of artesunate formulated as dry preparations to diffuse through the nasal mucosa. Taken together, those results are part of the rationale for the use of intranasal artesunate as a malaria pre-referral treatment.

## **List of Abbreviations**

BEH: Ethylene Bridged Hybrid; DMSO: dimethyl sulfoxide; FBS: foetal bovine serum; KRB: krebs ringer buffer; MEM: minimum essential medium; MS: mass spectrometry; NaF: fluorescein sodium salt; NLCs: Nanostructure Lipid carriers; NEAA: non-essential amino-acids; MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; PBS: phosphate buffer solution.

## **Declarations**

*Ethics approval and consent to participate*

Not applicable

*Availability of data and materials*

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

*Competing interests*

The authors have no competing interest to declare.

## References

1. World malaria report 2020 [Internet]. [cited 2021 May 7]. Available from: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240015791>
2. Tukwasibwe S, Nakimuli A, Traherne J, Chazara O, Jayaraman J, Trowsdale J, et al. Variations in killer-cell immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen genes and immunity to malaria. *Cell Mol Immunol*. 2020 Aug;17(8):799–806.
3. Milner DA. Malaria Pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018 Jan;8(1):a025569.
4. White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, Faiz MA, Mokuolu OA, Dondorp AM. Malaria. *The Lancet*. 2014 Feb;383(9918):723–35.
5. Cowman AF, Healer J, Marapana D, Marsh K. Malaria: Biology and Disease. *Cell*. 2016 Oct;167(3):610–24.
6. Severe Malaria. *Tropical Medicine & International Health*. 2014;19(s1):7–131.
7. Gomes M, Faiz M, Gyapong J, Warsame M, Agbenyega T, Babiker A, et al. Pre-referral rectal artesunate to prevent death and disability in severe malaria: a placebo-controlled trial. *Lancet*. 2009 Feb 14;373(9663):557–66.
8. Jannin V, Lemagnen G, Gueroult P, Larrouture D, Tuleu C. Rectal route in the 21st Century to treat children. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2014 Jun 30;73:34–49.
9. Marijon A, Bonnot G, Fourier A, Bringer C, Lavoignat A, Gagnieu M-C, et al. Efficacy of intranasal administration of artesunate in experimental cerebral malaria. *Malar J*. 2014 Dec 16;13:501.
10. Bewley S. Getting to the bottom of evidence based medicine. *BMJ*. 2008 Apr 5;336(7647):764.
11. Abd-Elal RMA, Shamma RN, Rashed HM, Bendas ER. Trans-nasal zolmitriptan novasomes: in-vitro preparation, optimization and in-vivo evaluation of brain targeting efficiency. *Drug Delivery*. 2016 Nov 21;23(9):3374–86.

12. Dey S, Mahanti B, Mazumder B, Malgope A. Nasal drug delivery: An approach of drug delivery through nasal route. 2011;14.
13. Gänger S, Schindowski K. Tailoring Formulations for Intranasal Nose-to-Brain Delivery: A Review on Architecture, Physico-Chemical Characteristics and Mucociliary Clearance of the Nasal Olfactory Mucosa. *Pharmaceutics*. 2018 Aug 3;10(3).
14. Wang Y, Mukhopadhyay R, Roy S, Kapoor A, Su Y-P, Charman SA, et al. Inhibition of Cytomegalovirus Replication with Extended-Half-Life Synthetic Ozonides. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019 Jan;63(1).
15. Selvaraj K, Gowthamarajan K, Karri VVSR. Nose to brain transport pathways an overview: potential of nanostructured lipid carriers in nose to brain targeting. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 2018 Nov 17;46(8):2088–95.
16. Crowe TP, Greenlee MHW, Kanthasamy AG, Hsu WH. Mechanism of intranasal drug delivery directly to the brain. *Life Sci*. 2018 Feb 15;195:44–52.
17. Reichl S, Becker K. Cultivation of RPMI 2650 cells as an in-vitro model for human transmucosal nasal drug absorption studies: optimization of selected culture conditions. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2012;64(11):1621–30.
18. Gonçalves VSS, Matias AA, Poejo J, Serra AT, Duarte CMM. Application of RPMI 2650 as a cell model to evaluate solid formulations for intranasal delivery of drugs. *International Journal of Pharmaceutics*. 2016 Dec 30;515(1):1–10.
19. Mercier C, Hodin S, He Z, Perek N, Delavenne X. Pharmacological Characterization of the RPMI 2650 Model as a Relevant Tool for Assessing the Permeability of Intranasal Drugs. *Mol Pharmaceutics*. 2018 Jun 4;15(6):2246–56.
20. Zeng H-B, Dong L-Q, Xu C, Zhao X-H, Wu L-G. Artesunate promotes osteoblast differentiation through miR-34a/DKK1 axis. *Acta Histochemica*. 2020 Oct 1;122(7):151601.
21. Zuo W, Wang Z-Z, Xue J. Artesunate Induces Apoptosis of Bladder Cancer Cells by miR-16 Regulation of COX-2 Expression. *Int J Mol Sci*. 2014 Aug 15;15(8):14298–312.

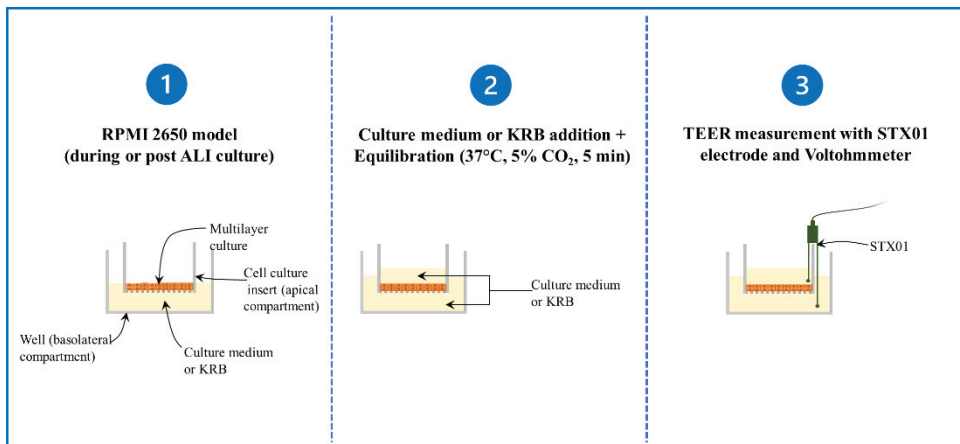
22. ISO 10993-5:2009(en), Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity [Internet]. [cited 2021 Aug 13]. Available from: <https://www.iso.org/obp/ui#iso:std:iso:10993:-5:ed-3:v1:en>
23. López-García J, Lehocký M, Humpolíček P, Sába P. HaCaT Keratinocytes Response on Antimicrobial Atelocollagen Substrates: Extent of Cytotoxicity, Cell Viability and Proliferation. *J Funct Biomater*. 2014 May 8;5(2):43–57.
24. Gerber W, Steyn D, Kotzé A, Svitina H, Weldon C, Hamman J. Capsaicin and Piperine as Functional Excipients for Improved Drug Delivery across Nasal Epithelial Models. *Planta Med*. 2019 Sep;85(13):1114–23.
25. Srinivasan B, Kolli AR, Esch MB, Abaci HE, Shuler ML, Hickman JJ. TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *J Lab Autom*. 2015 Apr;20(2):107–26.
26. Wengst A, Reichl S. RPMI 2650 epithelial model and three-dimensional reconstructed human nasal mucosa as in vitro models for nasal permeation studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2010 Feb;74(2):290–7.
27. Boucher RC, Yankaskas JR, Cotton CU, Knowles MR, Stutts MJ. Cell culture approaches to the investigation of human airway ion transport. *Eur J Respir Dis Suppl*. 1987;153:59–67.
28. Cotton CU, Stutts MJ, Knowles MR, Gatzky JT, Boucher RC. Abnormal apical cell membrane in cystic fibrosis respiratory epithelium. An in vitro electrophysiologic analysis. *J Clin Invest*. 1987 Jan;79(1):80–5.
29. Ladel S, Schlossbauer P, Flamm J, Luksch H, Mizaikoff B, Schindowski K. Improved In Vitro Model for Intranasal Mucosal Drug Delivery: Primary Olfactory and Respiratory Epithelial Cells Compared with the Permanent Nasal Cell Line RPMI 2650. *Pharmaceutics*. 2019 Aug 1;11(8):367.
30. Kürti L, Veszelka S, Bocsik A, Ózsvári B, Puskás LG, Kittel Á, et al. Retinoic acid and hydrocortisone strengthen the barrier function of human RPMI 2650 cells, a model for nasal epithelial permeability. *Cytotechnology*. 2013 May;65(3):395–406.

31. Wengst A, Reichl S. RPMI 2650 epithelial model and three-dimensional reconstructed human nasal mucosa as in vitro models for nasal permeation studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2010 Feb;74(2):290–7.
32. RPMI 2650 | ATCC [Internet]. [cited 2021 Aug 13]. Available from: <https://www.atcc.org/products/ccl-30>
33. Raffetin A, Bruneel F, Roussel C, Thellier M, Buffet P, Caumes E, et al. Use of artesunate in non-malarial indications. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 2018 Jun 1;48(4):238–49.
34. Asai A, Okuda T, Sonoda E, Yamauchi T, Kato S, Okamoto H. Drug Permeation Characterization of Inhaled Dry Powder Formulations in Air-Liquid Interfaced Cell Layer Using an Improved, Simple Apparatus for Dispersion. *Pharm Res*. 2016 Feb;33(2):487–97.
35. Grainger CI, Greenwell LL, Martin GP, Forbes B. The permeability of large molecular weight solutes following particle delivery to air-interfaced cells that model the respiratory mucosa. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2009 Feb 1;71(2):318–24.
36. Haynes RK, Chan H-W, Lung C-M, Ng N-C, Wong H-N, Shek LY, et al. Artesunate and Dihydroartemisinin (DHA): Unusual Decomposition Products Formed under Mild Conditions and Comments on the Fitness of DHA as an Antimalarial Drug. *ChemMedChem*. 2007 Oct 8;2(10):1448–63.
37. Pires A, Fortuna A, Alves G, Falcão A. Intranasal Drug Delivery: How, Why and What for? *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 2009 Oct 12;12(3):288–311.
38. Mygind N, Dahl R. Anatomy, physiology and function of the nasal cavities in health and disease. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1998 Jan;29(1–2):3–12.
39. Arora P, Sharma S, Garg S. Permeability issues in nasal drug delivery. *Drug Discovery Today*. 2002 Sep 15;7(18):967–75.
40. Agbo CP, Ugwuanyi TC, Ugwuoke WI, McConville C, Attama AA, Ofokansi KC. Intranasal artesunate-loaded nanostructured lipid carriers: A convenient alternative to



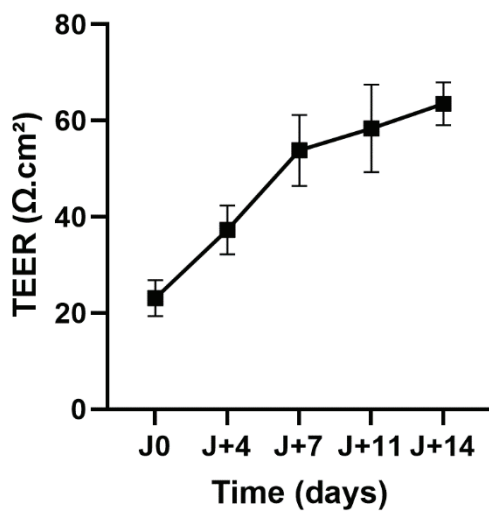
parenteral formulations for the treatment of severe and cerebral malaria. *Journal of Controlled Release*. 2021 Jun;334:224–36.

## Figures:



**Figure 1. TEER measurement protocol**

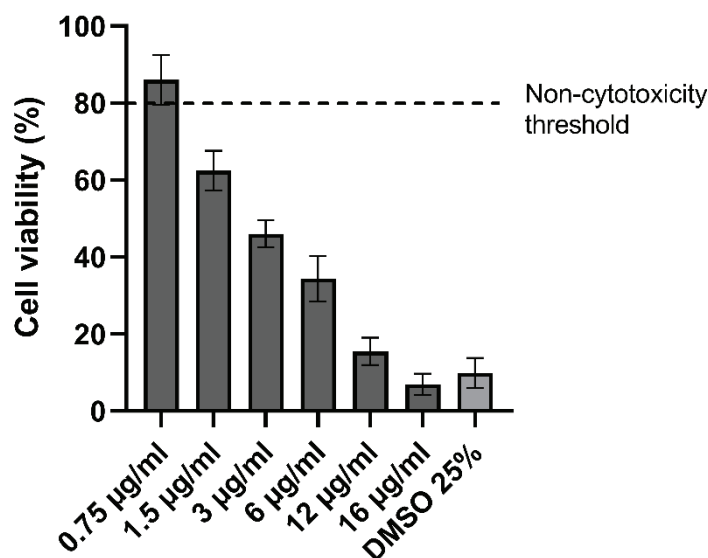
ALI = air-liquid interface culture; KRB = krebs-ringer buffer; min = minutes; TEER = Transepithelial electrical resistance.



**Figure 2. TEER during ALI culture of RPMI 2650 cells**

TEER was measured on day 0, 4, 7, 11, and 14 during ALI culture of RPMI 2650 cells to monitor the formation of tight junctions. TEER values progressively increased and reached a mean value of  $63 \pm 4 \Omega \cdot \text{cm}^2$  on day 14. Data are expressed as mean  $\pm$  SD (n = 9)

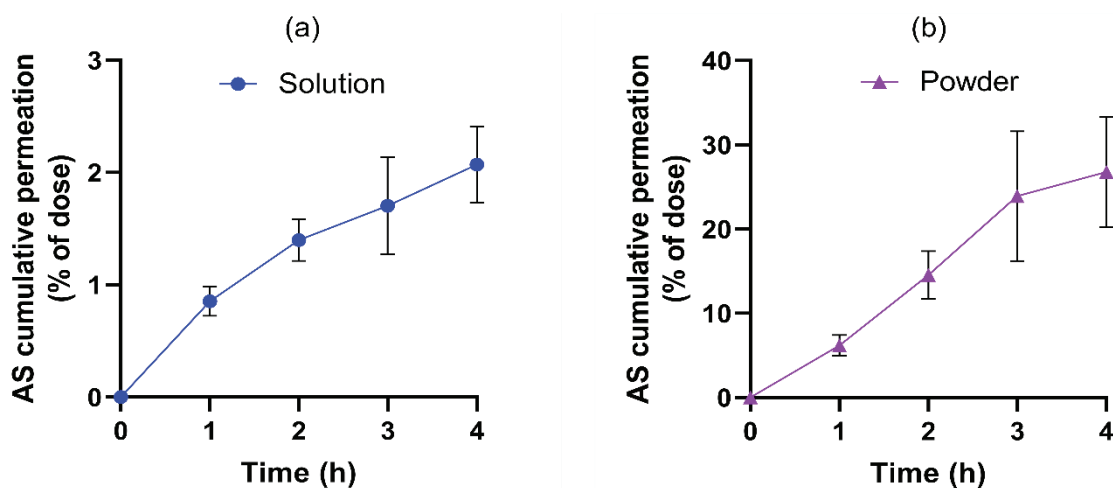
TEER = Transepithelial Electrical Resistance; ALI = Air-Liquide Interface.



**Figure 3.** RPMI 2650 cell viabilities according to artesunate concentration using a MTT assay.

Artesunate cytotoxicity was assessed on RPMI 2650 cells prior to performing permeation tests with AS solutions. No cytotoxicity was recorded for the 0.75 µg/ml artesunate solution (cell viability > 80%). Data are expressed as the mean ± SD (n = 3)

DMSO = dimethyl sulfoxide; black-dotted line = non-cytotoxicity threshold according to ISO 10993-5:2009).



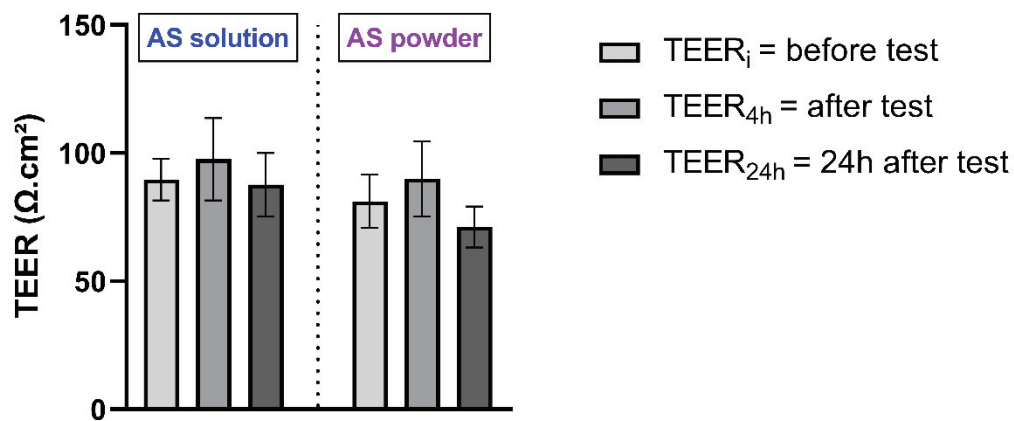
**Figure 4.** Artesunate permeation assay

**(a)** Permeation assay of artesunate in solution (0.75 µg/ml)

**(b)** Permeation assay of artesunate in a powder (20 µg/mg)

Artesunate permeation assays were performed on RPMI 2650 cell model using artesunate solution and powder formulations. Data are expressed as the mean ± SD (n ≥ 3).

AS = artesunate; h = hours.



**Figure 5. TEER measurements before and after the permeation assay of artesunate solution and powder formulations**

Cytotoxicity of artesunate was assessed according to TEER measurements before and after the permeation assay. Data are expressed as the mean  $\pm$  SD ( $n \geq 3$ ).

TEER = Transepithelial electrical resistance;  $\text{TEER}_i$  = TEER before permeation assay;  $\text{TEER}_{4h}$  = TEER immediately after permeation assay;  $\text{TEER}_{24h}$  = TEER 24 h after permeation assay initiation.

### III. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Notre travail de thèse avait pour objectif d'obtenir des preuves de la possible utilisation de la voie IN pour l'administration du traitement de pré-transfert du paludisme sévère chez l'homme.

#### *Analyse de la pharmacocinétique de l'artésunate*

L'artésunate est sans aucun doute le PA le plus important actuellement disponible dans l'arsenal des thérapies antipaludiques. Son utilisation large en monothérapie ou en association, pour le traitement des formes simples et sévères du paludisme, l'expose à des risques accrus de sélection de résistances en cas de mésusage. La résistance aux dérivés de l'artémisinine de *Pf* est déjà répandue dans la région du Grand-Mékong(194). Les échecs thérapeutiques après traitements ACT y sont courants et liés à la perte de sensibilité parallèle des molécules à élimination lente associées sur *Pf* (ex : méfloquine, pipéraquline)(195–197).

L'analyse d'isolats de *Pf* prélevés sur différents sites africains a révélé la présence de mutations faux-sens du gène Kelch13 à des fréquences généralement faibles (< 5%). Ces mutations, probablement d'origine autochtone, présentent une variabilité allélique importante. La grande majorité d'entre elles n'ont cependant pas encore été associées à un ralentissement de la clairance parasitaire(195,198).

Deux marqueurs biologiques de résistance partielle initialement identifiés en Asie du Sud-Est, R561H et P574L, avaient été détectés au Rwanda entre 2011 et 2015 mais ils n'étaient pas associés à une modification de la clairance parasitaire(199). Une étude a mis en évidence l'augmentation de leur fréquence dans la population Rwandaise. La mutation R561H dont l'origine autochtone est probable, a de plus été associée à un ralentissement de la clairance parasitaire chez des patients traités par artemether-luméfantine(75). La MRU a aussi participé à l'identification d'une mutation du gène SERCA (*Pf*ATPase6), mise en évidence après un échec thérapeutique et qui pourrait conférer à *Pf* une tolérance aux dérivés de l'artémisinine. Le test RSA (ring-stage survival assay) réalisé sur un mutant *Pf*NF54 obtenu par édition génomique CRISPR/Cas9 de ce gène a en effet été concluant. Il y a donc quelques données en faveur de l'émergence en Afrique de mutations conférant résistance aux dérivés de l'artémisinine. Elles sont cependant encore trop limitées et l'aspect sporadique de ces mutations, couplé au maintien de l'efficacité des ACT sur le continent impose de rester prudent sur les conclusions à en tirer. L'apparition et la diffusion de résistances aux dérivés de l'artémisinine en Afrique reste tout de même une éventualité qui ne doit pas être écartée. Elle

justifie la mise en place d'interventions pour optimiser leur utilisation et limiter ainsi ce risque. Il nous est apparu pertinent d'analyser la PK de l'artésunate pour (i) dresser un bilan des connaissances, (ii) évaluer la pertinence d'une escalade de dose d'artésunate pour réduire le risque de sélection de clones résistants de *Pf* (dans la mesure où la molécule est bien tolérée) et (iii) d'étudier l'impact de la résistance sur l'efficacité *in vivo* de l'artésunate.

Ce travail bibliographique a porté sur 50 études, publiées entre 1997 et 2018. Il a confirmé la grande variabilité interindividuelle et inter-études des paramètres PK de l'artésunate et de la DHA. Elle pourrait s'expliquer, au moins en partie, par les conditions physiologiques variables des populations étudiées (âge et maturité enzymatique, grossesse, phase aiguë de la maladie etc.) mais aussi par le manque criant de standardisation dans la mise en place des protocoles d'étude. La variabilité des protocoles porte notamment sur le schéma d'échantillonnage, le type d'anticoagulant utilisé, le type et la sensibilité des méthodes de dosage, ou encore le protocole d'administration du traitement. Il a été démontré, par exemple, que le recueil d'échantillons de sang sur fluorure de sodium/oxalate de potassium (anticoagulant) inhibe les estérases plasmatiques et réduit ainsi la dégradation *ex vivo* de l'artésunate. La demi-vie courte de l'artésunate, surtout en IV (en général < 15 minutes), nécessite d'initier les prélèvements de sang dès les premières minutes après traitement pour ne pas manquer l'essentiel de l'exposition sanguine à la molécule. Enfin, la prise orale concomitante d'artésunate et d'un repas hypercalorique réduit de 84% la constante d'absorption ( $K_a$ ) intestinale de la molécule(200). La variabilité générée par ces différents paramètres complique ainsi la comparaison des données extraites de ces différentes études.

Pour évaluer la pertinence d'une escalade des doses d'artésunate dans le traitement du paludisme, nous avons étudié l'évolution de l'exposition plasmatique au PA et à la DHA en fonction de la dose d'artésunate administrée pour les voies orale et IV. Cette analyse n'était pas réalisable pour les autres voies d'administration (IM et IR) à cause de données disponibles insuffisantes. Cette exposition a été appréciée par l'étude des paramètres PK suivants :

- La  $C_{max}$  = concentration plasmatique maximale obtenue après administration d'une dose donnée
- L' $AUC_{0-\infty}$  (littéralement « air sous la courbe ») = quantité du médicament qui atteint la circulation systémique = exposition plasmatique au PA après l'administration d'une dose donnée
- Et la  $C_{ss}$  ( $C_{av}$  dans l'article publié) = Concentration plasmatique moyenne à l'équilibre (exposition plasmatique moyenne atteinte lorsque le passage du médicament dans la circulation systémique est compensé par sa clairance plasmatique). Cette concentration



doit être dans l'intervalle thérapeutique de la molécule pour garantir son efficacité et limiter sa iatrogénie. Elle a été calculée uniquement chez les patients.

L'artésunate étant rapidement métabolisé en DHA *in vivo*, l'appréciation de l'exposition systémique au médicament a été réalisée en sommant les valeurs des paramètres décrits ci-dessus pour l'AS et la DHA (ex : C<sub>max</sub> globale = C<sub>max</sub> (AS) + C<sub>max</sub> (DHA) en nM). L'augmentation de la dose d'artésunate administrée *per os* (1 – 5 mg/kg/j) s'est révélée positivement corrélée aux valeurs de C<sub>max</sub> et d'AUC dans la population globale d'étude (patients + volontaires sains) et chez les patients (R<sup>2</sup> = 0.80 – 0.90). Par voie IV, cette observation a aussi été vérifiée dans la population globale et chez les volontaires (0,5 – 8 mg/kg/j, R<sup>2</sup> ≥ 0.97). L'analyse n'a pas pu être réalisée chez les patients traités par voie IV pour données insuffisantes. Cette analyse a ainsi démontré qu'une escalade des doses d'artésunate s'accompagne d'une augmentation de l'exposition sanguine au PA dans les populations concernées et pour les doses testées.

La comparaison des données de C<sub>ss</sub> post-administration orale et IV d'artésunate à la concentration inhibitrice médiane *in vivo* de la DHA (EC<sub>50</sub>) a permis d'évaluer l'impact de la résistance aux dérivés de l'artémisinine sur l'efficacité *in vivo* de l'artésunate. Nous avons émis le postulat selon lequel l'EC<sub>50</sub> de la DHA, estimée à 9,92 µg/L dans une étude, est similaire à celle de l'artésunate car elle est responsable de l'essentiel de son effet antipaludique(201). Cette analyse a démontré que le profil thérapeutique de l'artésunate est très favorable par voie IV (ratio C<sub>ss</sub>/EC<sub>50</sub> = 34 – 57 pour artésunate 2,2 – 2,5 mg/kg) mais l'est beaucoup moins par voie orale (ratio C<sub>ss</sub>/EC<sub>50</sub> = 2,5 – 13,4 pour artésunate 1 à 5 mg/kg). En effet, dans le contexte de l'existence d'un effet parasiticide dose-dépendant, on peut s'attendre à ce que des valeurs de C<sub>ss</sub> élevées s'accompagnent d'une meilleure clairance parasitaire. De plus, une augmentation de la résistance se traduirait par une augmentation de l'EC<sub>50</sub>. Un doublement de l'EC<sub>50</sub> pourrait donc s'accompagner d'un risque élevé d'échec thérapeutique après traitement par voie orale alors que l'effet thérapeutique serait conservé par voie IV.

Avant de pouvoir conclure sur la pertinence de l'escalade des doses, il est nécessaire de vérifier que l'augmentation de l'exposition à l'artésunate s'accompagne bien d'une meilleure clairance parasitaire *in vivo*. Dans une précédente étude, Dondorp et son équipe ont évalué l'efficacité de deux traitements administrés par voie orale sur deux populations différentes(68) :

- Population 1 : en zone de résistance avérée aux dérivés de l'artémisinine (Cambodge)
  - Traitement 1 : 2 mg/kg/j d'artésunate pendant 7 jours

- Traitement 2 : 4 mg/kg/j d'artésunate pendant 3 jours suivis par 2 doses de méfloquine
- Population 2 : en zone de non-résistance aux dérivés de l'artémisinine (Thaïlande)
  - Traitement 1 : idem population 1
  - Traitement 2 : idem population 1

Comme attendue, la clairance parasitaire a été plus lente chez les patients en zone de résistance qu'en zone de non-résistance pour les deux traitements testés (84 vs 48 heures). L'augmentation de la dose d'artésunate s'est accompagnée d'une clairance parasitaire plus rapide en zone de non-résistance mais cette observation n'a pas été retrouvée en zone de résistance. De plus, les taux d'exposition à l'artésunate et DHA étaient similaires entre les deux populations et aucune relation de corrélation n'a pu être établie entre ces paramètres PK, les paramètres patients-dépendants (ex : poids) et le retard de clairance parasitaire observé en zone de résistance. Les auteurs n'ont émis aucune hypothèse qui permettrait d'expliquer ces résultats. Une deuxième étude réalisée par la même équipe a évalué l'influence d'une escalade de dose plus importante (6 et 8 mg/kg/J administrée en une ou deux fois) sur la clairance parasitaire dans des infections résistantes et non résistantes aux dérivés de l'artémisinine. Si l'escalade de dose s'est bien accompagnée d'une augmentation proportionnelle des taux d'expositions sériques à l'artésunate et à la DHA, elle n'a pas eu d'effet significatif sur la clairance parasitaire(202). Des études supplémentaires semblent donc nécessaires pour conclure quant à l'impact réel de l'escalade de dose d'artésunate sur les taux d'expositions sanguins aux médicaments et sur la clairance parasitaire pour les voies orale et IV.

### **Applicabilité du traitement de pré-transfert du paludisme par voie IN**

L'artésunate est administré par voie IR dans le cadre du traitement de pré-transfert (PTF) du paludisme. Par cette voie, sa PK s'illustre par une variabilité interindividuelle marquée et est comparable à celle de la voie orale à quelques exceptions près : la résorption intestinale de l'artésunate est plus lente ce qui aboutit à un retard dans l'obtention de la C<sub>max</sub> (T<sub>max</sub> = 0,9 – 3,2 heures), le pic plasmatique est moins important et sa demi-vie est plus longue(138,141,147,203). La biodisponibilité relative de la DHA a été estimée à moins de 60% chez des enfants atteints de paludisme modérément sévère et chez des volontaires sains malgré l'absence de premier passage hépatique associée à la voie IR (203,204). Enfin, une dernière étude n'a pas trouvé de différence significative entre l'exposition à la DHA obtenue après

traitement *per os* et celle obtenue par voie IR(205). L'absorption plus lente de l'artésunate IR pourrait en partie expliquer le délai de 4 à 12 heures rapporté nécessaire pour obtenir une clairance parasitaire significative par cette voie d'administration(7). Le contexte d'utilisation du traitement PTF relève cependant de l'urgence. Il est question de freiner rapidement la progression de la maladie pour permettre au patient de rejoindre un centre de soins habilité à sa prise en charge. Une absorption rapide et importante de l'antipaludique est donc cruciale pour maximiser les chances de survie du patient.

La voie IN permet l'absorption rapide de PA, parfois en l'espace de quelques minutes seulement, dans la circulation sanguine (ex : lacosamide) et le SNC (ex : cocaïne, vitamine B12)(155,206). La barrière épithéliale nasale est particulièrement perméable. Elle ne s'oppose pas à l'absorption de molécules hydrophiles de haut poids moléculaire comme démontré par leur détection rapide dans le cerveau après administration IN (insuline, facteur de croissance nerveuse NGF)(155,207). L'artésunate administré précocement par voie IN pourrait prévenir l'explosion systémique de la charge parasitaire, empêcher la séquestration des formes mûres de *Pf* dans le cerveau et prévenir le développement du paludisme grave et des séquelles neurologiques associées (ex : neuropaludisme). Administrée à un stade plus avancé de la maladie, cela pourrait permettre d'empêcher le décès imminent du patient et de réduire la profondeur des séquelles en empêchant la formation de lésions cérébrales plus importantes. Ces hypothèses sont basées sur les résultats de l'étude pré-clinique menée par le MRU et qui a évalué l'efficacité et la toxicité de l'artésunate IN sur modèle murin de neuropaludisme (ECM)(12). Le traitement précoce a prévenu le développement des complications cérébrales. Le traitement tardif, administré alors que les symptômes neurologiques étaient déjà présents, a permis d'obtenir la rémission des souris impaludées. Bien que prometteurs, les résultats obtenus sur cet ECM (*Plasmodium berghei* ANKA PBA + souris femelles CBA/J) ne sont pas directement transposables chez l'homme à cause des spécificités d'espèces. La région olfactive par exemple représente jusqu'à 50% de la muqueuse nasale chez les rongeurs contre seulement 5% chez l'homme. La surface d'absorption des PA est donc significativement plus restreinte chez l'homme et pourrait limiter l'effet thérapeutique attendu après administration IN d'artésunate. Ainsi, des thérapies prometteuses qui avaient été identifiées sur cet ECM n'avaient finalement pas généré d'effets bénéfiques chez l'homme (anti-TNF, dexaméthasone)(208).

Ce travail de thèse a été l'occasion d'apporter les premières preuves d'une possible utilisation de la voie IN pour l'administration du traitement de pré-transfert du paludisme chez l'homme.

Nous avons pour cela étudié la perméation et la toxicité de l'artésunate sur un modèle *in vitro* de muqueuse nasale humaine. Le modèle est obtenu par culture de cellules cancéreuses de la lignée RPMI 2650 en condition immergée pendant 8 jours puis à l'interface air-liquide pendant 14 jours. Ce protocole permet l'obtention d'une culture multicouches (10 – 15 couches) d'épaisseur comparable à celle de la muqueuse nasale humaine qui est monocouche et pseudostratifiée(209,210). Le modèle RPMI 2650 a été validé pour l'étude de la perméation *in vitro* de PA et ses similitudes avec la muqueuse nasale humaine excisée incluses, notamment(176,190,211) :

- Sa perméabilité ; il présente les caractéristiques d'un « épithélium coulant », à l'image de la muqueuse nasale. Ces caractéristiques sont appréciées par ses valeurs de TEER, par le schéma d'expression et de distribution des protéines constitutives de ses jonctions serrées, et par les coefficients de perméabilité apparents de marqueurs de diffusion témoins(176,211)
- La production d'une substance mucoïde au pôle apical des cellules ; cet aspect est en tension car certaines études ne le retrouvent pas(190)
- L'expression de pompes à efflux à la membrane cellulaire mais de manière semble-t-il insuffisante pour qu'elles soient fonctionnelles (P-gp, MRP1, MRP2, BCRP)(211).

D'autres modèles d'étude auraient pu être considérés mais ils présentent plus de contraintes. Par exemple, l'utilisation d'explants de muqueuse nasale prélevés directement sur sujet humain dans le cadre de chirurgies de routine (ex : turbinectomie). Ce modèle *ex vivo* présentent les caractéristiques histologiques, physiologiques et biochimiques les plus proches des conditions *in vivo*. Il est cependant difficile à obtenir et s'accompagne d'une variabilité inter et intra-individuelle importante. Les modèles obtenus à partir de cultures primaires de cellules épithéliales saines sont difficiles à mettre en place (isolation + ensemencement), à entretenir (sénescence naturelle) et à standardiser (variabilité des propriétés en fonctions du donneur). Ces cultures présentent en plus des valeurs de TEER bien supérieures à celles obtenues sur muqueuse nasale excisée et sont donc non physiologiques (600 – 3100  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ). Enfin, l'utilisation de tissus d'origine animale est possible mais elle s'accompagne de différences histologiques et physiologiques spécifiques d'espèces(176,210,212). Leur utilisation nécessite une certaine dextérité pour la réalisation de dissections reproductibles et pour l'utilisation de cellules de diffusion pour réaliser les tests de perméation. Ces cellules sont souvent associées à la formation de bulles d'air à l'interface tissu/compartiment récepteur qui peuvent perturber la diffusion des PA étudiés(213). Le modèle RPMI 2650 a ainsi été jugé pertinent parce qu'il

permet d'approximer la muqueuse nasale humaine dans nos conditions d'étude et pour des questions de praticabilité (cellules immortelles faciles à obtenir et mise en place simple du modèle reproductible).

Deux formulations ont été utilisées pour étudier la perméation de l'artésunate : une solution à reconstitution extemporanée (similaire à celle utilisée par voie parentérale) et un mélange pulvérulent (artésunate + fécule de maïs comme diluant inerte). Ces deux formulations ont permis de répondre aux propriétés physicochimiques défavorables de l'artésunate. Sa faible solubilité aqueuse a été contrecarrée par une étape de pré-solubilisation du PA solide dans du bicarbonate de sodium à 5% pour la préparation de la solution. De plus, La reconstitution extemporanée de cette dernière et la nature sèche de la formulation en poudre ont permis de réduire l'hydrolyse spontanée de l'artésunate.

La teneur en artésunate dans le milieu donneur était plus importante pour la formulation de type poudre (207 µg) que pour la solution (0.375 µg). Nous n'avons pas pu réduire cette teneur pour la formulation de type poudre car il n'était pas possible de peser des masses inférieures de manière reproductible. Quant à la formulation de type solution, il n'était pas possible d'augmenter sa teneur en artésunate à cause du volume limité du compartiment donneur et de la toxicité dose-dépendante de l'artésunate sur les cellules RPMI 2650. Ces deux formulations n'ont pas altéré la fonction barrière du modèle lors des tests de perméation. Elles ont cependant été associées à de faibles pourcentages finaux de perméation, seulement 2% de la dose initiale d'artésunate pour la solution et 27% pour la poudre après quatre heures de tests.

Le meilleur pourcentage de perméation obtenu avec la formulation en poudre pourrait s'expliquer par la mise en place d'un gradient de concentration plus important à l'interface cellulaire, favorisant la meilleure diffusion passive du PA par des mécanismes transcellulaire et/ou paracellulaire (190,214,215).

Les faibles pourcentages de perméation de l'AS interpellent cependant car ils pourraient annoncer une faible biodisponibilité de la molécule chez l'homme après administration IN. Ils sont au moins en partie explicables par l'instabilité aqueuse de l'artésunate, qui s'hydrolyse dans le milieu de diffusion, et par la méthode de dosage LC-MS/MS. Cette dernière ne quantifie que la molécule native et pas son métabolite (DHA). Ainsi, l'artésunate qui a diffusé mais qui a ensuite été hydrolysé et la fraction du PA qui a diffusé sous forme de DHA (après hydrolyse de l'artésunate dans le compartiment donneur) n'ont pas été quantifiés. La diffusion du PA en fin d'essai pour les deux formulations est donc globalement sous-estimée.

La perméation de l'artésunate pourrait être améliorée par un travail d'optimisation galénique. On estime que seulement 1% de la dose d'un PA administré par voie IN est directement délivrée dans le cerveau(172). Il est donc nécessaire de charger la formulation galénique en actif de sorte à garantir son absorption cérébrale à des concentrations thérapeutiques. Le développement de nanoformulations d'artésunate (nanoémulsions, nanoparticules lipidiques solides, nanoparticules mucoadhésives etc.) pourrait permettre (i) d'augmenter la concentration de PA administrable en une dose, (ii) de protéger l'actif des dégradations chimiques et enzymatiques et d'améliorer sa stabilité *in situ* et (iii) de favoriser sa absorption systémique et son absorption cérébrale par NtB(172). Un tel travail de formulation n'a pas pu être réalisé durant la thèse car sa complexité nécessite une approche multidisciplinaire difficile à mettre en place en période de pandémie (Covid19). Cette approche doit impliquer chimistes, biochimistes, galénistes, médecins ORL, ingénieurs etc. pour le développement de formulations candidates, leur évaluation (screening des propriétés physicochimiques, stabilité, cytotoxicité...) et le développement simultané de dispositifs d'administration adaptés.

La laboratoire MRU a pour objectif de continuer à explorer la piste du traitement de pré-transfert IN du paludisme en utilisant une formulation en poudre. La prochaine étape de ce projet est d'étudier le schéma de dépôt de la poudre d'artésunate après pulvérisation dans un modèle de cavité nasale humaine. En fonction des résultats obtenus, il pourrait être intéressant de discuter du développement d'une formulation en poudre avec des propriétés mucoadhésives et contenant des promoteurs d'absorption pour une meilleure absorption de l'artésunate *in vivo*.

### **Méthodes de dosage biologique quantitative et semi-quantitative de l'artésunate**

Ce travail de développement de méthode avait pour objectif de répondre au besoin de doser les échantillons d'artésunate issus des tests de diffusion. Ce type d'échantillon est généralement dosé par méthodes HPLC – MS (ou HPLC – MS/MS) car elles sont très sensibles et permettent de quantifier le PA et ses éventuels métabolites(216,217). Dans notre cas, le dosage de la DHA était important pour apprécier pleinement la diffusion de l'artésunate sur le modèle d'étude. Les méthodes par spectrométrie de masse, développées en collaboration avec des équipes externes au MRU, n'ont pas permis de répondre à ce besoin. Nous avons donc entrepris de développer une méthode d'analyse d'échantillons réalisable par nos soins au sein du laboratoire. Sa simplicité devait aussi promouvoir son utilisation dans des laboratoires à ressources limitées, en zone d'endémie palustre par exemple.



Nous avons développé deux méthodes basées sur le principe du test de chimiosensibilité *in vitro* Sybr-Green de *Pf*. Les tests de chimiosensibilité sont utilisés en routine dans les laboratoires qui travaillent sur la thématique du paludisme, y compris en Afrique(193). Leur réalisation ne nécessite donc ni formation technique, ni matériel supplémentaire.

Le test quantitatif permet de relier l'effet biologique d'un échantillon X, qui inclue celui de la molécule native et de la DHA, à sa concentration en artésunate. D'autres méthodes basées sur un principe similaire ont déjà été décrites dans la littérature. Teja-Isavadharm et son équipe ont modifié le test de chimiosensibilité de *Pf* par micro-dilution isotopique et ont exprimé leurs résultats de dosage en « équivalent DHA »(193). Une autre méthode, développée au sein même du MRU, a utilisé la méthode Sybr-green en exprimant les résultats en « équivalent artésunate »(191). C'est d'ailleurs cette dernière qui a inspiré le développement des méthodes biologiques décrites dans ce manuscrit. Ces deux méthodes (Teja-Isavadharm et MRU) sont similaires dans le sens où elles quantifient des dérivés de l'artémisinine dans des échantillons sanguins. De plus, chaque dosage s'accompagnait d'une courbe de calibration à priori réalisée en parallèle. L'originalité de la méthode quantitative développée dans de ce travail devait reposer sur la mise en place d'une courbe de calibration moyenne, construite en amont de l'analyse des échantillons, comme pour une méthode de dosage plus classique. Cette courbe moyenne a été obtenue à partir des données de neuf essais indépendants pour prendre en compte la variabilité des tests biologiques. Cette dernière peut en effet influencer la croissance parasitaire(218–220). La validation de la courbe a été réalisée à l'aide d'échantillons contrôles. Elle a mis en évidence une surestimation de leur concentration réelle en artésunate ( $> 1,5X$ ). Ces résultats indiquent que les échantillons contrôles ont eu des effets biologiques sur les parasites supérieurs à ceux théoriquement attendus. La courbe de calibration moyenne ne permet vraisemblablement pas de pallier les variabilités de croissance parasitaire inter-essais pour doser précisément des échantillons.

La deuxième méthode, semi-quantitative, avait pour but d'estimer la concentration d'un échantillon X en comparant son effet biologique sur les parasites à celui d'une référence de concentration égale à la  $CI_{50}$  de l'artésunate ( $>$  ou  $< CI_{50}$ ). Elle nous a permis de comparer les échantillons des tests de diffusion utilisant l'artésunate en solution ( $[AS] < CI_{50}$ ) et ceux des tests utilisant l'artésunate en poudre ( $[AS] > CI_{50}$ ). Son indication est cependant limitée dès lors que deux échantillons à comparer génèrent le même résultat ( $>$  ou  $< CI_{50}$ ). La méthode semi-quantitative peut donc être intéressante pour comparer des échantillons dans un contexte de screening rapide mais elle ne remplace pas une méthode quantitative validée.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Postels DG, Birbeck GL. Cerebral malaria. *Handb Clin Neurol*. 2013;114:91–102.
2. White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, Faiz MA, Mokuolu OA, Dondorp AM. Malaria. *The Lancet*. 2014 Feb;383(9918):723–35.
3. Paludisme [Internet]. [cited 2020 Apr 9]. Available from: <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/malaria>
4. World Health Organization. World malaria report 2020: 20 years of global progress and challenges [Internet]. World Health Organization; 2020 [cited 2021 Sep 10]. 247 p. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/337660>
5. L'Algérie et l'Argentine certifiées exemptes de paludisme par l'OMS [Internet]. [cited 2021 Oct 5]. Available from: <https://www.who.int/fr/news/item/22-05-2019-algeria-and-argentina-certified-malaria-free-by-who>
6. Teklehaimanot and Paola Mejia, Awash. Malaria and Poverty. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1136(1):32–7.
7. Gomes M, Faiz M, Gyapong J, Warsame M, Agbenyega T, Babiker A, et al. Pre-referral rectal artesunate to prevent death and disability in severe malaria: a placebo-controlled trial. *Lancet*. 2009 Feb 14;373(9663):557–66.
8. Robertson JS. Substitute for Cocoa Butter as a Suppository Base in Tropical Countries. *J Pharm Sci*. 1961 Jan;50(1):21–3.
9. Persaud S, Eid S, Swiderski N, Serris I, Cho H. Preparations of Rectal Suppositories Containing Artesunate. *Pharmaceutics*. 2020 Mar 2;12(3):222.
10. Jannin V, Lemagnen G, Gueroult P, Larrouture D, Tuleu C. Rectal route in the 21st Century to treat children. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014 Jun 30;73:34–49.
11. Bewley S. Getting to the bottom of evidence based medicine. *BMJ*. 2008 Apr 5;336(7647):764.

12. Marijon A, Bonnot G, Fourier A, Bringer C, Lavoignat A, Gagnieu M-C, et al. Efficacy of intranasal administration of artesunate in experimental cerebral malaria. *Malar J.* 2014 Dec 16;13:501.
13. Plewes K, Leopold SJ, Kingston HWF, Dondorp AM. Malaria: What's New in the Management of Malaria? *Infect Dis Clin North Am.* 2019 Mar 1;33(1):39–60.
14. Picot S, Bienvenu A-L. Plasmodium. In: Reference Module in Biomedical Sciences [Internet]. Elsevier; 2020 [cited 2021 Oct 12]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128187319000410>
15. Lomar AV, Vidal JE, Lomar FP, Barbas CV, de Matos GJ, Boulos M. Acute respiratory distress syndrome due to vivax malaria: case report and literature review. *Braz J Infect Dis Off Publ Braz Soc Infect Dis.* 2005 Oct;9(5):425–30.
16. Valecha N, Pinto RGW, Turner GDH, Kumar A, Rodrigues S, Dubhashi NG, et al. Histopathology of fatal respiratory distress caused by Plasmodium vivax malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 2009 Nov;81(5):758–62.
17. Tjitra E, Anstey NM, Sugiarto P, Warikar N, Kenangalem E, Karyana M, et al. Multidrug-resistant Plasmodium vivax associated with severe and fatal malaria: a prospective study in Papua, Indonesia. *PLoS Med.* 2008 Jun 17;5(6):e128.
18. Milner DA. Malaria Pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018 Jan;8(1):a025569.
19. Cowman AF, Healer J, Marapana D, Marsh K. Malaria: Biology and Disease. *Cell.* 2016 Oct;167(3):610–24.
20. Severe Malaria. *Trop Med Int Health.* 2014;19(s1):7–131.
21. Berry A, Iriart X, Wilhelm N, Valentin A, Cassaing S, Witkowski B, et al. Imported Plasmodium knowlesi Malaria in a French Tourist Returning from Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* 2011 Apr 5;84(4):535–8.
22. Gething PW, Patil AP, Smith DL, Guerra CA, Elyazar IR, Johnston GL, et al. A new world malaria map: Plasmodium falciparum endemicity in 2010. *Malar J.* 2011 Dec 20;10:378.

23. Mouchet J, Carnevale P, Coosemans M, Fontenille D, Ravaonjanahary C, Richard A, et al. Typologie du paludisme en Afrique. *Cah Santé*. 1993 Jan 1;3.
24. O'Meara WP, Bejon P, Mwangi TW, Okiro EA, Peshu N, Snow RW, et al. Effect of a fall in malaria transmission on morbidity and mortality in Kilifi, Kenya. *Lancet*. 2008 Nov 1;372(9649):1555–62.
25. Idro R, Jenkins NE, Newton CR. Pathogenesis, clinical features, and neurological outcome of cerebral malaria. *Lancet Neurol*. 2005 Dec;4(12):827–40.
26. Deloron P, Schieman R, Ralaimazava P, Coulaud J-P, Le Bras J, Kony S, et al. DO AFRICAN IMMIGRANTS LIVING IN FRANCE HAVE LONG-TERM MALARIAL IMMUNITY? *Am J Trop Med Hyg*. 2005 Jan 1;72(1):21–5.
27. Carnevale P, Robert V, Molez J-F, Baudon D. *Epidémiologie générale : faciès épidémiologiques des paludismes en Afrique subsaharienne*. :12.
28. CDC - DPDx - Malaria [Internet]. 2020 [cited 2021 Oct 4]. Available from: <https://www.cdc.gov/dpdx/malaria/index.html>
29. Moya-Alvarez V, Abellana R, Cot M. Pregnancy-associated malaria and malaria in infants: an old problem with present consequences. *Malar J*. 2014 Dec;13(1):271.
30. Desai M, Kuile FO ter, Nosten F, McGready R, Asamo K, Brabin B, et al. Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. *Lancet Infect Dis*. 2007 Feb 1;7(2):93–104.
31. Rogerson SJ, Hviid L, Duffy PE, Leke RF, Taylor DW. Malaria in pregnancy: pathogenesis and immunity. *Lancet Infect Dis*. 2007 Feb 1;7(2):105–17.
32. Huynh B-T, Fievet N, Gbaguidi G, Dechavanne S, Borgella S, Guézo-Mévo B, et al. Influence of the Timing of Malaria Infection during Pregnancy on Birth Weight and on Maternal Anemia in Benin. *Am J Trop Med Hyg*. 2011 Aug 1;85(2):214–20.
33. Kalilani-Phiri L, Thesing PC, Nyirenda OM, Mawindo P, Madanitsa M, Membe G, et al. Timing of Malaria Infection during Pregnancy Has Characteristic Maternal, Infant and Placental Outcomes. *PLoS ONE*. 2013 Sep 18;8(9):e74643.

34. Valea I, Tinto H, Drabo MK, Huybregts L, Sorgho H, Ouedraogo J-B, et al. An analysis of timing and frequency of malaria infection during pregnancy in relation to the risk of low birth weight, anaemia and perinatal mortality in Burkina Faso. *Malar J.* 2012 Mar 16;11:71.
35. Brabin BJ, Romagosa C, Abdelgalil S, Menéndez C, Verhoeff FH, McGready R, et al. The Sick Placenta—The Role of Malaria. *Placenta.* 2004 May 1;25(5):359–78.
36. Menendez C. Malaria during pregnancy: A priority area of malaria research and control. *Parasitol Today.* 1995 May 1;11(5):178–83.
37. Nosten F, Rogerson SJ, Beeson JG, McGready R, Mutabingwa TK, Brabin B. Malaria in pregnancy and the endemicity spectrum: what can we learn? *Trends Parasitol.* 2004 Sep 1;20(9):425–32.
38. Briand V, Cottrell G, Massougbdji A, Cot M. Intermittent preventive treatment for the prevention of malaria during pregnancy in high transmission areas. *Malar J.* 2007 Dec;6(1):1–7.
39. Saito M, Briand V, Min AM, McGready R. Deleterious effects of malaria in pregnancy on the developing fetus: a review on prevention and treatment with antimalarial drugs. *Lancet Child Adolesc Health.* 2020 Oct;4(10):761–74.
40. Nosten F, McGready R, Simpson JA, Thwai KL, Balkan S, Cho T, et al. Effects of *Plasmodium vivax* malaria in pregnancy. *The Lancet.* 1999 Aug 14;354(9178):546–9.
41. Bardají A, Sigauque B, Sanz S, Maixenchs M, Ordi J, Aponte JJ, et al. Impact of Malaria at the End of Pregnancy on Infant Mortality and Morbidity. *J Infect Dis.* 2011 Mar 1;203(5):691–9.
42. Singh MP, Saha KB, Chand SK, Sabin LL. The economic cost of malaria at the household level in high and low transmission areas of central India. *Acta Trop.* 2019 Feb;190:344–9.
43. Nájera JA, González-Silva M, Alonso PL. Some Lessons for the Future from the Global Malaria Eradication Programme (1955–1969). *PLoS Med.* 2011 Jan 25;8(1):e1000412.

44. World Health Organization. Towards the end of the epidemics: first progress report [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2017 [cited 2021 Sep 12]. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/258692>
45. Chukwuekezie O, Nwosu E, Nwangwu U, Dogunro F, Onwude C, Agashi N, et al. Resistance status of *Anopheles gambiae* (s.l.) to four commonly used insecticides for malaria vector control in South-East Nigeria. *Parasit Vectors*. 2020 Mar 24;13:152.
46. Phillips-Howard PA, Nahlen BL, Kolczak MS, Hightower AW, ter Kuile FO, Alaii JA, et al. Efficacy of permethrin-treated bed nets in the prevention of mortality in young children in an area of high perennial malaria transmission in western Kenya. *Am J Trop Med Hyg*. 2003 Apr;68(4 Suppl):23–9.
47. World Health Organization. World malaria report 2015 [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2015 [cited 2021 Sep 16]. 243 p. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/200018>
48. Nkya TE, Akhouayri I, Poupardin R, Batengana B, Mosha F, Magesa S, et al. Insecticide resistance mechanisms associated with different environments in the malaria vector *Anopheles gambiae*: a case study in Tanzania. *Malar J*. 2014 Jan 25;13:28.
49. Gnanguenon V, Agossa FR, Badirou K, Govoetchan R, Anagonou R, Oke-Agbo F, et al. Malaria vectors resistance to insecticides in Benin: current trends and mechanisms involved. *Parasit Vectors*. 2015 Apr 12;8:223.
50. Desai M, Hill J, Fernandes S, Walker P, Pell C, Gutman J, et al. Prevention of malaria in pregnancy. *Lancet Infect Dis*. 2018 Apr;18(4):e119–32.
51. World Health Organization. WHO policy recommendation: seasonal malaria chemoprevention (SMC) for *Plasmodium falciparum* malaria control in highly seasonal transmission areas of the Sahel sub-region in Africa [Internet]. World Health Organization; 2012 [cited 2021 Sep 16]. Report No.: WHO/HTM/GMP/2012.02. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/337978>
52. Ashley EA, Phyo AP. Drugs in Development for Malaria. *Drugs*. 2018;78(9):861–79.
53. Phul NH, Day N. Intraleucocytic malaria pigment and prognosis in severe malaria. :5.



54. Silamut K, White NJ. Relation of the stage of parasite development in the peripheral blood to prognosis in severe falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1993 Jul;87(4):436–43.
55. White NJ, Krishna S. Treatment of malaria: some considerations and limitations of the current methods of assessment. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1989 Nov;83(6):767–77.
56. Maslin J, Coton T, Martinaud C, Lignac D, Journaux L, Grassin F, et al. Test rapide de diagnostic du paludisme : une curieuse discordance. :5.
57. Wilson ML. Malaria Rapid Diagnostic Tests. *Clin Infect Dis.* 2012;54(11):1637–41.
58. Gatton ML, Chaudhry A, Glenn J, Wilson S, Ah Y, Kong A, et al. Impact of Plasmodium falciparum gene deletions on malaria rapid diagnostic test performance. *Malar J.* 2020 Nov 4;19:392.
59. Das S, Peck RB, Barney R, Jang IK, Kahn M, Zhu M, et al. Performance of an ultra-sensitive Plasmodium falciparum HRP2-based rapid diagnostic test with recombinant HRP2, culture parasites, and archived whole blood samples. *Malar J.* 2018 Mar 17;17:118.
60. Iriart X, Menard S, Chauvin P, Mohamed HS, Charpentier E, Mohamed MA, et al. Misdiagnosis of imported falciparum malaria from African areas due to an increased prevalence of pfhrp2/pfhrp3 gene deletion: the Djibouti case. *Emerg Microbes Infect.* 2020 Jan 1;9(1):1984–7.
61. WHO Guidelines for malaria [Internet]. [cited 2021 Sep 24]. Available from: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/guidelines-for-malaria>
62. Adjuik M, Babiker A, Garner P, Olliaro P, Taylor W, White N, et al. Artesunate combinations for treatment of malaria: meta-analysis. *Lancet Lond Engl.* 2004 Jan 3;363(9402):9–17.
63. Bruneel F, Tubach F, Corne P, Megarbane B, Mira J-P, Peytel E, et al. Severe Imported Falciparum Malaria: A Cohort Study in 400 Critically Ill Adults. *PLoS ONE.* 2010 Oct 8;5(10):e13236.
64. Management of severe malaria - Third edition WHO handbook.

65. Dondorp AM, Fanello CI, Hendriksen IC, Gomes E, Seni A, Chhaganlal KD, et al. Artesunate versus quinine in the treatment of severe falciparum malaria in African children (AQUAMAT): an open-label, randomised trial. *The Lancet*. 2010 Nov;376(9753):1647–57.
66. Dondorp A, Nosten F, Stepniewska K, Day N, White N, South East Asian Quinine Artesunate Malaria Trial (SEAQUAMAT) group. Artesunate versus quinine for treatment of severe falciparum malaria: a randomised trial. *Lancet Lond Engl*. 2005 Sep 27;366(9487):717–25.
67. Noedl H, Se Y, Schaefer K, Smith BL, Socheat D, Fukuda MM. Evidence of Artemisinin-Resistant Malaria in Western Cambodia. *N Engl J Med*. 2008 Dec 11;359(24):2619–20.
68. Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyo AP, Tarning J, et al. Artemisinin Resistance in Plasmodium falciparum Malaria. *N Engl J Med*. 2009 Jul 30;361(5):455–67.
69. World Health Organization. Artemisinin resistance and artemisinin-based combination therapy efficacy: status report [Internet]. World Health Organization; 2018 [cited 2021 Sep 24]. Report No.: WHO/CDS/GMP/2018.18. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/274362>
70. Arya A, Kojom Foko LP, Chaudhry S, Sharma A, Singh V. Artemisinin-based combination therapy (ACT) and drug resistance molecular markers: A systematic review of clinical studies from two malaria endemic regions – India and sub-Saharan Africa. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2021 Apr;15:43–56.
71. World Health Organization. Artemisinin and artemisinin-based combination therapy resistance: status report [Internet]. World Health Organization; 2017 [cited 2021 Sep 24]. Report No.: WHO/HTM/GMP/2017.9. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/255213>
72. Arley F, Witkowski B, Amaratunga C, Beghain J, Langlois A-C, Khim N, et al. A molecular marker of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum malaria. *Nature*. 2014 Jan 2;505(7481):50–5.

73. Talman AM, Clain J, Duval R, Ménard R, Ariey F. Artemisinin Bioactivity and Resistance in Malaria Parasites. *Trends Parasitol.* 2019 Dec;35(12):953–63.
74. Dondorp AM, Smithuis FM, Woodrow C, Seidlein L von. How to Contain Artemisinin- and Multidrug-Resistant Falciparum Malaria. *Trends Parasitol.* 2017 May 1;33(5):353–63.
75. Uwimana A, Umulisa N, Venkatesan M, Svigel SS, Zhou Z, Munyaneza T, et al. Association of Plasmodium falciparum kelch13 R561H genotypes with delayed parasite clearance in Rwanda: an open-label, single-arm, multicentre, therapeutic efficacy study. *Lancet Infect Dis.* 2021 Aug;21(8):1120–8.
76. Rts T, Partnership (2014) SCT. Efficacy and Safety of the RTS,S/AS01 Malaria Vaccine during 18 Months after Vaccination: A Phase 3 Randomized, Controlled Trial in Children and Young Infants at 11 African Sites. *PLOS Med.* 2014 Jul 29;11(7):e1001685.
77. Sackey AH. Musings on malaria morbidity and mortality after the new Mosquirix® vaccine. *Ghana Med J.* 2019 Jun;53(2):187–8.
78. Asante KP, Malm K, Darko DM, Koram KA. Re: Musings on malaria morbidity and mortality after the new Mosquirix® vaccine. *Ghana Med J.* 2019 Sep;53(3):252–3.
79. OMS | Questions et réponses sur le programme de mise en œuvre de la vaccination antipaludique (MVIP) [Internet]. WHO. World Health Organization; [cited 2020 May 1]. Available from: <http://www.who.int/malaria/media/malaria-vaccine-implementation-qa/fr/>
80. WHO recommends groundbreaking malaria vaccine for children at risk [Internet]. [cited 2021 Oct 7]. Available from: <https://www.who.int/news/item/06-10-2021-who-recommends-groundbreaking-malaria-vaccine-for-children-at-risk>
81. Chandramohan D, Zongo I, Sagara I, Cairns M, Yerbanga R-S, Diarra M, et al. Seasonal Malaria Vaccination with or without Seasonal Malaria Chemoprevention. *N Engl J Med.* 2021 Sep 9;385(11):1005–17.
82. MMV-supported projects | Medicines for Malaria Venture [Internet]. [cited 2021 Sep 25]. Available from: <https://www.mmv.org/research-development/mmv-supported-projects>

83. Wells TNC, van Huijsduijnen RH, Van Voorhis WC. Malaria medicines: a glass half full? *Nat Rev Drug Discov.* 2015 Jun;14(6):424–42.
84. DNDi Annual Report 2020 | DNDi [Internet]. 2021 [cited 2021 Sep 25]. Available from: <https://dndi.org/about/annual-reports/annual-report-2020/>
85. Mounkaila Harouna A, Amorissani-Folquet M, Eboua FT, Desmonde S, N’Gbeche S, Aka EA, et al. Effect of cotrimoxazole prophylaxis on the incidence of malaria in HIV-infected children in 2012, in Abidjan, Côte d’Ivoire: a prospective cohort study. *BMC Infect Dis.* 2015 Aug 7;15:317.
86. Mbeye N, ter Kuile FO, Davies M-A, Phiri K, Egger M, Wandeler G. Cotrimoxazole prophylactic treatment prevents malaria in children in sub-Saharan Africa: Systematic review and meta-analysis. *Trop Med Int Health TM IH.* 2014 Sep;19(9):1057–67.
87. Phyto AP, Jittamala P, Nosten FH, Pukrittayakamee S, Imwong M, White NJ, et al. Antimalarial activity of artefenomel (OZ439), a novel synthetic antimalarial endoperoxide, in patients with *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria: an open-label phase 2 trial. *Lancet Infect Dis.* 2016;16(1):61–9.
88. Adoke Y, Zoleko-Manego R, Ouoba S, Tiono AB, Kaguthi G, Bonzela JE, et al. A randomized, double-blind, phase 2b study to investigate the efficacy, safety, tolerability and pharmacokinetics of a single-dose regimen of ferroquine with artefenomel in adults and children with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Malar J.* 2021 May 19;20:222.
89. WANECAM consortium kicks off clinical study for next-generation antimalarial drug [Internet]. EDCTP. [cited 2021 Oct 9]. Available from: <http://www.edctp.org/news/wanecam-consortium-kicks-off-clinical-study-for-next-generation-antimalarial-drug/>
90. Novartis Pharmaceuticals. A Phase 2 Interventional, Multicenter, Randomized Open Label Study to Determine the Effective and Tolerable Dose of KAF156 and Lumefantrine Solid Dispersion Formulation in Combination, Given Once Daily for 1, 2 and 3-days to Adults and Children With Uncomplicated *Plasmodium Falciparum* Malaria [Internet]. [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov); 2021 Sep [cited 2021 Sep 23]. Report No.: NCT03167242. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03167242>

91. Bouwman SAM, Zoleko-Manego R, Renner KC, Schmitt EK, Mombo-Ngoma G, Grobusch MP. The early preclinical and clinical development of cipargamin (KAE609), a novel antimalarial compound. *Travel Med Infect Dis*. 2020 Jul;36:101765.
92. McCarthy JS, Abd-Rahman AN, Collins KA, Marquart L, Griffin P, Kümme A, et al. Defining the Antimalarial Activity of Cipargamin in Healthy Volunteers Experimentally Infected with Blood-Stage *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2021 Jan 20;65(2):e01423-20.
93. Schmitt EK, Ndayisaba G, Yeka A, Asante KP, Grobusch MP, Karita E, et al. Efficacy of cipargamin (KAE609) in a randomized, Phase II dose-escalation study in adults in sub-Saharan Africa with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2021 Aug 19 [cited 2021 Sep 26];(ciab716). Available from: <https://doi.org/10.1093/cid/ciab716>
94. Paquet T, Le Manach C, Cabrera DG, Younis Y, Henrich PP, Abraham TS, et al. Antimalarial efficacy of MMV390048, an inhibitor of *Plasmodium* phosphatidylinositol 4-kinase. *Sci Transl Med*. 2017 Apr 26;9(387):eaad9735.
95. Watson JA, Nekkab N, White M. Tafenoquine for the prevention of *Plasmodium vivax* malaria relapse. *Lancet Microbe*. 2021 May 1;2(5):e175–6.
96. Slater HC, Ross A, Ouédraogo AL, White LJ, Nguon C, Walker PGT, et al. Assessing the impact of next-generation rapid diagnostic tests on *Plasmodium falciparum* malaria elimination strategies. *Nature*. 2015 Dec;528(7580):S94–101.
97. Desruisseaux MS, Machado FS, Weiss LM, Tanowitz HB, Golightly LM. Cerebral Malaria. *Am J Pathol*. 2010 Mar;176(3):1075–8.
98. Gay F, Zougbedé S, N'Dilimabaka N, Rebollo A, Mazier D, Moreno A. Cerebral malaria: What is known and what is on research. *Rev Neurol (Paris)*. 2012 Mar;168(3):239–56.
99. Cranston HA, Boylan CW, Carroll GL, Sutera SP, Williamson JR, Gluzman IY, et al. *Plasmodium falciparum* maturation abolishes physiologic red cell deformability. *Science*. 1984 Jan 27;223(4634):400–3.

100. Cooke B, Coppel R, Wahlgren M. Falciparum Malaria: Sticking up, Standing out and Outstanding. *Parasitol Today*. 2000 Oct 1;16(10):416–20.
101. Nunes-Silva S, Dechavanne S, Moussiliou A, Pstrąg N, Semblat J-P, Gangnard S, et al. Beninese children with cerebral malaria do not develop humoral immunity against the IT4-VAR19-DC8 PfEMP1 variant linked to EPCR and brain endothelial binding. *Malar J* [Internet]. 2015 Dec 8 [cited 2020 Apr 10];14. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4672576/>
102. Leech JH, Barnwell JW, Miller LH, Howard RJ. Identification of a strain-specific malarial antigen exposed on the surface of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *J Exp Med*. 1984 Jun 1;159(6):1567–75.
103. Pasloske BL, Howard RJ. Malaria, the red cell, and the endothelium. *Annu Rev Med*. 1994;45:283–95.
104. Rowe JA, Claessens A, Corrigan RA, Arman M. Adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Expert Rev Mol Med*. 2009 May 26;11:e16.
105. Chen Q, Schlichtherle M, Wahlgren M. Molecular aspects of severe malaria. *Clin Microbiol Rev*. 2000 Jul;13(3):439–50.
106. Turner L, Lavstsen T, Berger SS, Wang CW, Petersen JEV, Avril M, et al. Severe malaria is associated with parasite binding to endothelial protein C receptor. *Nature*. 2013 Jun 27;498(7455):502–5.
107. Smith JD, Rowe JA, Higgins MK, Lavstsen T. Malaria's deadly grip: cytoadhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Cell Microbiol*. 2013 Dec;15(12):1976–83.
108. Lennartz F, Adams Y, Bengtsson A, Olsen RW, Turner L, Ndam NT, et al. Structure-Guided Identification of a Family of Dual Receptor-Binding PfEMP1 that Is Associated with Cerebral Malaria. *Cell Host Microbe*. 2017 Mar 8;21(3):403–14.
109. Nishanth G, Schlüter D. Blood–Brain Barrier in Cerebral Malaria: Pathogenesis and Therapeutic Intervention. *Trends Parasitol*. 2019 Jul 1;35(7):516–28.



110. Kessler A, Dankwa S, Bernabeu M, Harawa V, Danziger SA, Duffy F, et al. Linking EPCR-binding PfEMP1 to brain swelling in pediatric cerebral malaria. *Cell Host Microbe*. 2017 Nov 8;22(5):601-614.e5.
111. Roy RV, Ardeshirylajimi A, Dinarvand P, Yang L, Rezaie AR. Occupancy of human EPCR by protein C induces  $\beta$ -arrestin-2 biased PAR1 signaling by both APC and thrombin. *Blood*. 2016 Oct 6;128(14):1884–93.
112. Newton CRJC, Warrell DA. Neurological manifestations of falciparum malaria. *Ann Neurol*. 1998 Jun;43(6):695–702.
113. Pasvol G, Weatherall DJ, Wilson RJM. Effects of foetal haemoglobin on susceptibility of red cells to *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 1977 Nov;270(5633):171–3.
114. Agbota G, Accrombessi M, Cottrell G, Martin-Prével Y, Milet J, Ouédraogo S, et al. Increased Risk of Malaria During the First Year of Life in Small-for-Gestational-Age Infants: A Longitudinal Study in Benin. *J Infect Dis*. 2019 Apr 19;219(10):1642–51.
115. Crawley J, Smith S, Kirkham F, Muthinji P, Waruiru C, Marsh K. Seizures and status epilepticus in childhood cerebral malaria. *QJM*. 1996 Aug 1;89(8):591–8.
116. Birbeck GL, Molyneux ME, Kaplan PW, Seydel KB, Chimalizeni YF, Kawaza K, et al. Blantyre Malaria Project Epilepsy Study (BMPES) of neurological outcomes in retinopathy-positive paediatric cerebral malaria survivors: a prospective cohort study. *Lancet Neurol*. 2010 Dec;9(12):1173–81.
117. Taylor TE, Fu WJ, Carr RA, Whitten RO, Mueller JG, Fosiko NG, et al. Differentiating the pathologies of cerebral malaria by postmortem parasite counts. *Nat Med*. 2004 Feb;10(2):143–5.
118. English M, Wale S, Binns G, Mwangi I, Sauerwein H, Marsh K. Hypoglycaemia on and after admission in Kenyan children with severe malaria. *QJM Mon J Assoc Physicians*. 1998 Mar;91(3):191–7.
119. Krishna S, Waller DW, Kuile F ter, Kwiatkowski D, Crawley J, Craddock CFC, et al. Lactic acidosis and hypoglycaemia in children with severe malaria: pathophysiological and prognostic significance. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1994 Jan;88(1):67–73.

120. English MC, Waruiru C, Lightowler C, Murphy SA, Kirigha G, Marsh K. Hyponatraemia and dehydration in severe malaria. *Arch Dis Child*. 1996 Mar;74(3):201–5.
121. Sowunmi A, Newton C, Waruiru C, Lightman S, Dunger D. Arginine vasopressin secretion in Kenyan children with severe malaria. *J Trop Pediatr*. 2000 Aug;46(4):195–9.
122. Molyneux ME, Taylor TE, Wirima JJ, Borgstein A. Clinical features and prognostic indicators in paediatric cerebral malaria: a study of 131 comatose Malawian children. *Q J Med*. 1989 May;71(265):441–59.
123. Beare NA, Southern C, Chalira C, Taylor TE, Molyneux ME, Harding SP. Prognostic significance and course of retinopathy in children with severe malaria. *Arch Ophthalmol Chic Ill 1960*. 2004 Aug;122(8):1141–7.
124. Holding PA, Stevenson J, Peshu N, Marsh K. Cognitive sequelae of severe malaria with impaired consciousness. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1999 Sep 1;93(5):529–34.
125. Newton C, Hien TT, White N. Cerebral malaria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2000 Oct;69(4):433–41.
126. Kochar DK, Shubhakaran null, Kumawat BL, Kochar SK, Halwai M, Makkar RK, et al. Cerebral malaria in Indian adults: a prospective study of 441 patients from Bikaner, north-west India. *J Assoc Physicians India*. 2002 Feb;50:234–41.
127. Looareesuwan S, Warrell DA, White NJ, Chanthavanich P, Warrell MJ, Chantaratherakitti S, et al. Retinal hemorrhage, a common sign of prognostic significance in cerebral malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 1983 Sep;32(5):911–5.
128. Aursudkij B, Wilairatana P, Vannaphan S, Walsh DS, Gordeux VR, Looareesuwan S. Pulmonary edema in cerebral malaria patients in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1998 Sep;29(3):541–5.
129. Tran TH, Day NP, Nguyen HP, Nguyen TH, Tran TH, Pham PL, et al. A controlled trial of artemether or quinine in Vietnamese adults with severe falciparum malaria. *N Engl J Med*. 1996 Jul 11;335(2):76–83.
130. Krishnan A, Karnad DR. Severe falciparum malaria: an important cause of multiple organ failure in Indian intensive care unit patients. *Crit Care Med*. 2003 Sep;31(9):2278–84.

131. Garg RK, Karak B, Misra S. Neurological manifestations of malaria : an update. *Neurol India*. 1999 Jun;47(2):85–91.
132. Warrell DA, Looareesuwan S, Warrell MJ, Kasemsarn P, Intaraprasert R, Bunnag D, et al. Dexamethasone proves deleterious in cerebral malaria. A double-blind trial in 100 comatose patients. *N Engl J Med*. 1982 Feb 11;306(6):313–9.
133. Newton CR, Krishna S. Severe falciparum malaria in children: current understanding of pathophysiology and supportive treatment. *Pharmacol Ther*. 1998 Jul;79(1):1–53.
134. Jain V, Nagpal AC, Joel PK, Shukla M, Singh MP, Gupta RB, et al. Burden of Cerebral Malaria in Central India (2004–2007). *Am J Trop Med Hyg*. 2008 Oct;79(4):636–42.
135. Carter J, Mung’ala-Odera V, Neville B, Murira G, Mturi N, Musumba C, et al. Persistent neurocognitive impairments associated with severe falciparum malaria in Kenyan children. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2005 Apr;76(4):476–81.
136. Varney NR, Roberts RJ, Springer JA, Connell SK, Wood PS. Neuropsychiatric sequelae of cerebral malaria in Vietnam veterans. *J Nerv Ment Dis*. 1997 Nov;185(11):695–703.
137. Rectal artesunate for pre-referral treatment of severe malaria [Internet]. [cited 2021 Oct 11]. Available from: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/WHO-HTM-GMP-2017.19>
138. Angus BJ. An evaluation of rectal artesunate for the pre-hospital management of severe malaria. *Expert Opin Pharmacother*. 2020 Apr 12;21(6):645–51.
139. Okebe J, Eisenhut M. Pre-referral rectal artesunate for severe malaria. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014 May 29;(5):CD009964.
140. Warsame M, Gyapong M, Mpeka B, Rodrigues A, Singlovic J, Babiker A, et al. Pre-referral Rectal Artesunate Treatment by Community-Based Treatment Providers in Ghana, Guinea-Bissau, Tanzania, and Uganda (Study 18): A Cluster-Randomized Trial. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2016 Dec 15;63(Suppl 5):S312–21.
141. Morris CA, Duparc S, Borghini-Fuhrer I, Jung D, Shin C-S, Fleckenstein L. Review of the clinical pharmacokinetics of artesunate and its active metabolite dihydroartemisinin

- following intravenous, intramuscular, oral or rectal administration. *Malar J.* 2011 Sep 13;10:263.
142. Simba DO, Warsame M, Kimbute O, Kakoko D, Petzold M, Tomson G, et al. Factors influencing adherence to referral advice following pre-referral treatment with artesunate suppositories in children in rural Tanzania. *Trop Med Int Health.* 2009;14(7):775–83.
143. Ajayi IO, Nsungwa-Sabiiti J, Siribié M, Falade CO, Sermé L, Balyeku A, et al. Feasibility of Malaria Diagnosis and Management in Burkina Faso, Nigeria, and Uganda: A Community-Based Observational Study. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2016 Dec 15;63(Suppl 5):S245–55.
144. Simba DO, Kakoko DC, Warsame M, Premji Z, Gomes MF, Tomson G, et al. Understanding caretakers' dilemma in deciding whether or not to adhere with referral advice after pre-referral treatment with rectal artesunate. *Malar J.* 2010 May 12;9:123.
145. Strachan CE, Nuwa A, Muhangi D, Okui AP, Helinski MEH, Tibenderana JK. Community understanding of the concept of pre-referral treatment and how this impacts on referral related decision-making following the provision of rectal artesunate: a qualitative study in western Uganda. *BMC Health Serv Res [Internet].* 2018 Jun 19 [cited 2020 Mar 3];18. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6006771/>
146. Rectal Artesunate Landscaping Assessment Report [Internet]. Severe Malaria Observatory. [cited 2021 Oct 11]. Available from: <https://www.severemalaria.org/resources/rectal-artesunate-landscaping-assessment-report>
147. de Carvalho LP, Kreidenweiss A, Held J. The preclinical discovery and development of rectal artesunate for the treatment of malaria in young children: a review of the evidence. *Expert Opin Drug Discov.* 2021 Jan 2;16(1):13–22.
148. Inthavilay S, Franchard T, Meimei Y, Ashley EA, Barennes H. Knowledge and acceptability of the rectal treatment route in Laos and its application for pre-referral emergency malaria treatment. *Malar J.* 2010 Nov 27;9:342.

149. Pires A, Fortuna A, Alves G, Falcão A. Intranasal Drug Delivery: How, Why and What for? *J Pharm Pharm Sci.* 2009 Oct 12;12(3):288–311.
150. Zhao H, Aoshi T, Kawai S, Mori Y, Konishi A, Ozkan M, et al. Olfactory Plays a Key Role in Spatiotemporal Pathogenesis of Cerebral Malaria. *Cell Host Microbe.* 2014 May;15(5):551–63.
151. Sprix (ketorolac intranasal) dosing, indications, interactions, adverse effects, and more. [Internet]. [cited 2021 Oct 3]. Available from: <https://reference.medscape.com/drug/sprix-ketorolac-intranasal-999564>
152. INSTANYL [Internet]. VIDAL. [cited 2021 Oct 3]. Available from: <https://www.vidal.fr/medicaments/gammes/instanyl-43334.html>
153. IMIGRANE 10 mg sol p pulv nasal [Internet]. VIDAL. [cited 2021 Oct 3]. Available from: <https://www.vidal.fr/medicaments/imigrane-10-mg-sol-p-pulv-nasal-8533.html>
154. Sahin-Yilmaz A, Naclerio RM. Anatomy and Physiology of the Upper Airway. *Proc Am Thorac Soc.* 2011 Mar 1;8(1):31–9.
155. Dhuria SV, Hanson LR, Frey WH. Intranasal delivery to the central nervous system: Mechanisms and experimental considerations. *J Pharm Sci.* 2010 Apr;99(4):1654–73.
156. Mygind N, Dahl R. Anatomy, physiology and function of the nasal cavities in health and disease. *Adv Drug Deliv Rev.* 1998 Jan;29(1–2):3–12.
157. Gänger S, Schindowski K. Tailoring Formulations for Intranasal Nose-to-Brain Delivery: A Review on Architecture, Physico-Chemical Characteristics and Mucociliary Clearance of the Nasal Olfactory Mucosa. *Pharmaceutics.* 2018 Aug 3;10(3).
158. Crowe TP, Greenlee MHW, Kanthasamy AG, Hsu WH. Mechanism of intranasal drug delivery directly to the brain. *Life Sci.* 2018 Feb 15;195:44–52.
159. Martins PP, Smyth HDC, Cui Z. Strategies to facilitate or block nose-to-brain drug delivery. *Int J Pharm.* 2019 Oct 30;570:118635.

160. Djupesland PG, Messina JC, Mahmoud RA. The nasal approach to delivering treatment for brain diseases: an anatomic, physiologic, and delivery technology overview. *Ther Deliv*. 2014 Jun;5(6):709–33.
161. Le Corre P. Administration intranasale des médicaments pour une action systémique. *Lett Pharmacol*. 2001 Nov;15(9).
162. Lochhead JJ, Thorne RG. Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012 May 15;64(7):614–28.
163. Dey S, Mahanti B, Mazumder B, Malgope A. Nasal drug delivery: An approach of drug delivery through nasal route. 2011;14.
164. Costantino HR, Illum L, Brandt G, Johnson PH, Quay SC. Intranasal delivery: physicochemical and therapeutic aspects. *Int J Pharm*. 2007 Jun 7;337(1–2):1–24.
165. Thorne RG, Emory CR, Ala TA, Frey WH. Quantitative analysis of the olfactory pathway for drug delivery to the brain. *Brain Res*. 1995 Sep;692(1–2):278–82.
166. Chow HS, Chen Z, Matsuura GT. Direct transport of cocaine from the nasal cavity to the brain following intranasal cocaine administration in rats. *J Pharm Sci*. 1999 Aug;88(8):754–8.
167. Illum L. Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system. *Eur J Pharm Sci*. 2000 Jul;11(1):1–18.
168. Selvaraj K, Gowthamarajan K, Karri VVSR. Nose to brain transport pathways an overview: potential of nanostructured lipid carriers in nose to brain targeting. *Artif Cells Nanomedicine Biotechnol*. 2018 Nov 17;46(8):2088–95.
169. Illum L. Is nose-to-brain transport of drugs in man a reality? *J Pharm Pharmacol*. 2004 Jan;56(1):3–17.
170. Banks WA, During MJ, Niehoff ML. Brain uptake of the glucagon-like peptide-1 antagonist exendin(9-39) after intranasal administration. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004 May;309(2):469–75.



171. Ross TM, Martinez PM, Renner JC, Thorne RG, Hanson LR, Frey WH. Intranasal administration of interferon beta bypasses the blood–brain barrier to target the central nervous system and cervical lymph nodes: a non-invasive treatment strategy for multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2004 Jun 1;151(1):66–77.
172. Wang Z, Xiong G, Tsang WC, Schätzlein AG, Uchegbu IF. Nose-to-Brain Delivery. *J Pharmacol Exp Ther.* 2019 Sep;370(3):593–601.
173. Behl CR, Pimplaskar HK, Sileno AP, deMeireles J, Romeo VD. Effects of physicochemical properties and other factors on systemic nasal drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 1998 Jan;29(1–2):89–116.
174. Arora P, Sharma S, Garg S. Permeability issues in nasal drug delivery. *Drug Discov Today.* 2002 Sep 15;7(18):967–75.
175. McMartin C, Hutchinson LEF, Hyde R, Peters GE. Analysis of Structural Requirements for the Absorption of Drugs and Macromolecules from the Nasal Cavity. *J Pharm Sci.* 1987 Jul 1;76(7):535–40.
176. Reichl S, Becker K. Cultivation of RPMI 2650 cells as an in-vitro model for human transmucosal nasal drug absorption studies: optimization of selected culture conditions. *J Pharm Pharmacol.* 2012;64(11):1621–30.
177. Antolić K, Juretić M, Dukovski BJ, Hafner A, Lovrić J, Pepić I. Cryocornea – toward enhancing the capacity and throughput of *ex vivo* corneal model. *Drug Dev Ind Pharm.* 2019 Dec 2;45(12):1856–61.
178. Szejtli J. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chem Rev.* 1998 Jul 30;98(5):1743–54.
179. Yang C, Gao H, Mitra AK. Chemical stability, enzymatic hydrolysis, and nasal uptake of amino acid ester prodrugs of acyclovir. *J Pharm Sci.* 2001 May 1;90(5):617–24.
180. Morimoto K, Miyazaki M, Kakemi M. Effects of proteolytic enzyme inhibitors on nasal absorption of salmon calcitonin in rats. *Int J Pharm.* 1995 Jan;113(1):1–8.

181. Lu C, Liu M, Fu H, Zhang W, Peng G, Zhang Y, et al. Novel thermosensitive in situ gel based on poloxamer for uterus delivery. *Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci*. 2015 Sep 18;77:24–8.
182. Qian S, Wong YC, Zuo Z. Development, characterization and application of in situ gel systems for intranasal delivery of tacrine. *Int J Pharm*. 2014 Jul 1;468(1–2):272–82.
183. Zaki NM, Awad GAS, Mortada ND, Abd ElHady SS. Rapid-onset intranasal delivery of metoclopramide hydrochloride. *Int J Pharm*. 2006 Dec;327(1–2):89–96.
184. Masiwa WL, Gadaga LL. Intestinal Permeability of Artesunate-Loaded Solid Lipid Nanoparticles Using the Everted Gut Method [Internet]. Vol. 2018, *Journal of Drug Delivery*. Hindawi; 2018 [cited 2020 Dec 14]. p. e3021738. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/jdd/2018/3021738/>
185. Haynes RK, Chan H-W, Lung C-M, Ng N-C, Wong H-N, Shek LY, et al. Artesunate and Dihydroartemisinin (DHA): Unusual Decomposition Products Formed under Mild Conditions and Comments on the Fitness of DHA as an Antimalarial Drug. *ChemMedChem*. 2007 Oct 8;2(10):1448–63.
186. Pubchem. Artesunate [Internet]. [cited 2018 Jul 2]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/129317578>
187. PubChem. (3R,5As,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-Decahydro-3,6,9-trimethyl-3,12-epoxy-12H-pyrano[4,3-j]-1,2-benzodioxepin-10-ol [Internet]. [cited 2021 Oct 12]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3000518>
188. Ansari M, Imran M, Hassan S, Tariq I, Murtaza G. Solubility enhancement of dihydroartemisinin using mixture of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin and PEG-6000. *Lat Am J Pharm*. 2014 Jan 1;33:483–91.
189. Paludisme grave : le HCSP recommande l'artésunate en première intention [Internet]. VIDAL. [cited 2021 Oct 6]. Available from: <https://www.vidal.fr/actualites/5895-paludisme-grave-le-hcsp-recommande-l-artesunate-en-premiere-intention.html>

190. Gonçalves VSS, Matias AA, Poejo J, Serra AT, Duarte CMM. Application of RPMI 2650 as a cell model to evaluate solid formulations for intranasal delivery of drugs. *Int J Pharm.* 2016 Dec 30;515(1):1–10.
191. Bienvenu A-L, Ferrandiz J, Kaiser K, Latour C, Picot S. Artesunate–erythropoietin combination for murine cerebral malaria treatment. *Acta Trop.* 2008 May 1;106(2):104–8.
192. Bacon DJ, Latour C, Lucas C, Colina O, Ringwald P, Picot S. Comparison of a SYBR Green I-Based Assay with a Histidine-Rich Protein II Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for In Vitro Antimalarial Drug Efficacy Testing and Application to Clinical Isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Apr;51(4):1172–8.
193. Teja-Isavadharm P, Peggins JO, Brewer TG, White NJ, Webster HK, Kyle DE. Plasmodium falciparum-Based Bioassay for Measurement of Artemisinin Derivatives in Plasma or Serum. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Mar;48(3):954–60.
194. Conrad MD, Rosenthal PJ. Antimalarial drug resistance in Africa: the calm before the storm? *Lancet Infect Dis.* 2019 Oct;19(10):e338–51.
195. Rosenthal PJ. Artemisinin Resistance Outside of Southeast Asia. *Am J Trop Med Hyg.* 2018 Dec;99(6):1357–9.
196. Arieu F, Ménard D. An Update on Artemisinin Resistance. In: Arieu F, Gay F, Ménard R, editors. *Malaria Control and Elimination* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2019 [cited 2021 Oct 19]. p. 141–9. (Methods in Molecular Biology; vol. 2013). Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-9550-9\\_10](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-9550-9_10)
197. Lohy Das JP, Kyaw MP, Nyunt MH, Chit K, Aye KH, Aye MM, et al. Population pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of artesunate in patients with artemisinin sensitive and resistant infections in Southern Myanmar. *Malar J.* 2018 Mar 23;17(1):126.
198. Kayiba NK, Yobi DM, Tshibangu-Kabamba E, Tuan VP, Yamaoka Y, Devleeschauwer B, et al. Spatial and molecular mapping of Pfk3 gene polymorphism in Africa in the era of emerging Plasmodium falciparum resistance to artemisinin: a systematic review. *Lancet Infect Dis.* 2021 Apr;21(4):e82–92.

199. Uwimana A, Legrand E, Stokes BH, Ndikumana J-LM, Warsame M, Umulisa N, et al. Emergence and clonal expansion of in vitro artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* kelch13 R561H mutant parasites in Rwanda. *Nat Med.* 2020;26(10):1602–8.
200. Tan B, Naik H, Jang I-J, Yu K-S, Kirsch LE, Shin C-S, et al. Population pharmacokinetics of artesunate and dihydroartemisinin following single- and multiple-dosing of oral artesunate in healthy subjects. *Malar J.* 2009;8(1):304.
201. Lohy Das J, Dondorp AM, Nosten F, Phyto AP, Hanpithakpong W, Ringwald P, et al. Population Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Modeling of Artemisinin Resistance in Southeast Asia. *AAPS J.* 2017;19(6):1842–54.
202. Das D, Tripura R, Phyto AP, Lwin KM, Tarning J, Lee SJ, et al. Effect of high-dose or split-dose artesunate on parasite clearance in artemisinin-resistant *falciparum* malaria. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2013 Mar;56(5):e48-58.
203. Krishna S, Planche T, Agbenyega T, Woodrow C, Agranoff D, Bedu-Addo G, et al. Bioavailability and Preliminary Clinical Efficacy of Intrarectal Artesunate in Ghanaian Children with Moderate Malaria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 Feb 1;45(2):509–16.
204. Awad MI, Eltayeb IB, Baraka OZ, Behrens RH, Alkadru AMY. Pharmacokinetics of Artesunate following Oral and Rectal Administration in Healthy Sudanese Volunteers. *Trop Doct.* 2004 Jul 1;34(3):132–3.
205. Navaratnam V, Mansor SM, Mordi MN, Akbar A, Abdullah MN. Comparative pharmacokinetic study of oral and rectal formulations of artesunic acid in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol.* 1998;54(5):411–4.
206. Gonçalves J, Alves G, Fonseca C, Carona A, Bicker J, Falcão A, et al. Is intranasal administration an opportunity for direct brain delivery of lacosamide? *Eur J Pharm Sci.* 2021 Feb;157:105632.
207. Agrawal M, Saraf S, Saraf S, Antimisiaris SG, Chougule MB, Shoyele SA, et al. Nose-to-brain drug delivery: An update on clinical challenges and progress towards approval of anti-Alzheimer drugs. *J Controlled Release.* 2018 Jul;281:139–77.

208. BRIAN de SOUZA J, Hafalla JCR, Riley EM, Couper KN. Cerebral malaria: why experimental murine models are required to understand the pathogenesis of disease. *Parasitology*. 2010 Apr;137(5):755–72.
209. Wengst A, Reichl S. RPMI 2650 epithelial model and three-dimensional reconstructed human nasal mucosa as in vitro models for nasal permeation studies. *Eur J Pharm Biopharm*. 2010 Feb;74(2):290–7.
210. Dolberg AM, Reichl S. Expression of P-glycoprotein in excised human nasal mucosa and optimized models of RPMI 2650 cells. *Int J Pharm*. 2016 Jul;508(1–2):22–33.
211. Mercier C, Hodin S, He Z, Perek N, Delavenne X. Pharmacological Characterization of the RPMI 2650 Model as a Relevant Tool for Assessing the Permeability of Intranasal Drugs. *Mol Pharm*. 2018 Jun 4;15(6):2246–56.
212. Agu RU, Jorissen M, Willems T, Augustijns P, Kinget R, Verbeke N. In-vitro nasal drug delivery studies: comparison of derivatised, fibrillar and polymerised collagen matrix-based human nasal primary culture systems for nasal drug delivery studies. *J Pharm Pharmacol*. 2010 Feb 18;53(11):1447–56.
213. Salmon D, Diouf E, Tall M-L, Pivot C, Pirot F. Mise au point d'un dispositif d'étude biopharmaceutique des médicaments. :1.
214. Asai A, Okuda T, Sonoda E, Yamauchi T, Kato S, Okamoto H. Drug Permeation Characterization of Inhaled Dry Powder Formulations in Air-Liquid Interfaced Cell Layer Using an Improved, Simple Apparatus for Dispersion. *Pharm Res*. 2016 Feb;33(2):487–97.
215. Grainger CI, Greenwell LL, Martin GP, Forbes B. The permeability of large molecular weight solutes following particle delivery to air-interfaced cells that model the respiratory mucosa. *Eur J Pharm Biopharm*. 2009 Feb 1;71(2):318–24.
216. Lindegårdh N, Dondorp AM, Singhasivanon P, White NJ, Day NPJ. Validation and application of a liquid chromatographic–mass spectrometric method for determination of artesunate in pharmaceutical samples. *J Pharm Biomed Anal*. 2007 Sep 21;45(1):149–53.

217. Zheng W, El-Aty AMA, Kim S-K, Choi J-M, Hacımüftüoğlu A, Shim J-H, et al. Quantification of artesunate and its metabolite, dihydroartemisinin, in animal products using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Sep Sci.* 2018;41(18):3538–46.
218. Ren S, Frymier PD. Reducing bioassay variability by identifying sources of variation and controlling key parameters in assay protocol. *Chemosphere.* 2004 Oct;57(2):81–90.
219. Rutvisuttinunt W, Chaorattanakawee S, Tyner SD, Teja-isavadharm P, Se Y, Yingyuen K, et al. Optimizing the HRP-2 in vitro malaria drug susceptibility assay using a reference clone to improve comparisons of *Plasmodium falciparum* field isolates. *Malar J.* 2012 Dec;11(1):325.
220. Mouton JW, Meletiadis J, Voss A, Turnidge J. Variation of MIC measurements: the contribution of strain and laboratory variability to measurement precision. *J Antimicrob Chemother.* 2018 Sep 1;73(9):2374–9.