



HAL
open science

Molécules hybrides antiplasmodiales ciblant les parasites résistants à l'artémisinine

Romain Mustière

► **To cite this version:**

Romain Mustière. Molécules hybrides antiplasmodiales ciblant les parasites résistants à l'artémisinine. Sciences pharmaceutiques. 2020. dumas-03095482

HAL Id: dumas-03095482

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03095482>

Submitted on 4 Jan 2021

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

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



THESE

Pour l'obtention du Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

**MOLECULES HYBRIDES ANTIPLASMODIALES CIBLANT LES PARASITES
RESISTANTS A L'ARTEMISININE**

Présentée par
Romain MUSTIERE

**Soutenu publiquement le 24 Août 2020
devant le jury composé de**

Mme Valérie COLLOT	Professeur des universités - UNICAEN	Président du jury
Mme Monique N'DIAYE	Maitre de conférences des universités - UNICAEN	Examineur
Mr Pierre VERHAEGHE	Professeur des universités – Université Toulouse 3 Paul Sabatier	Examineur

Thèse dirigée par Valérie Collot

LISTE DES ENSEIGNANTS-CHERCHEURS

Directeur de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques
Professeur Michel BOULOUARD

Assesseurs

Professeur Pascale SCHUMANN-BARD
Professeur Anne-Sophie VOISIN-CHIRET

Directrice administrative
Madame Sarah CHEMTOB

Directrice administrative adjointe
Madame Emmanuelle BOURDON

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

BOULOUARD Michel	Physiologie, Pharmacologie
BUREAU Ronan	Biophysique, Chémoinformatique
COLLOT Valérie	Pharmacognosie
DALLEMAGNE Patrick	Chimie médicinale
DAUPHIN François	Physiologie, Pharmacologie
DELEPEE Raphaël	Chimie analytique
FABIS Frédéric	Chimie organique
FRERET Thomas	Physiologie, Pharmacologie
GARON David	Botanique, Mycologie, Biotechnologies
GIARD Jean-Christophe	Bactériologie, Virologie
MALZERT-FREON Aurélie	Pharmacie galénique
ROCHAIS Christophe	Chimie organique
SCHUMANN-BARD Pascale	Physiologie, Pharmacologie
SICHEL François	Toxicologie
SOPKOVA Jana	Biophysique, Drug design
VOISIN-CHIRET Anne-Sophie	Chimie médicinale

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

ANDRE Véronique – HDR	Biochimie, Toxicologie
BOUET Valentine – HDR	Physiologie, Pharmacologie
CAILLY Thomas – HDR	Chimie bio-inorganique, Chimie organique
DENOYELLE Christophe – HDR	Biologie cellulaire et moléculaire, Biochimie, Cancérologie
DHALLUIN Anne	Bactériologie, Virologie, Immunologie
ELDIN de PECOULAS Philippe – HDR	Parasitologie, Mycologie médicale
GROO Anne-Claire	Pharmacie galénique
KIEFFER Charline	Chimie médicinale

KRIEGER Sophie (Praticien hospitalier) – HDR	Biologie clinique
LAPORTE-WOJCIK Catherine	Chimie bio-inorganique
LEBAILLY Pierre – HDR	Santé publique
LECHEVREL Mathilde – HDR	Toxicologie
LEGER Marianne	Physiologie, Pharmacologie
LEPAILLEUR Alban – HDR	Modélisation moléculaire
N'DIAYE Monique	Parasitologie, Mycologie médicale, Biochimie clinique
PAIZANIS Eleni	Physiologie, Pharmacologie
PEREIRA-ROSENFELD Maria de Fatima	Chimie organique et thérapeutique
POTTIER Ivannah	Chimie et toxicologie analytiques
PREVOST Virginie – HDR	Chimie analytique, Nutrition, Education thérapeutique du patient
QUINTIN Jérôme	Pharmacognosie
RIOULT Jean-Philippe	Botanique, Mycologie, Biotechnologies
SINCE Marc	Chimie analytique
VILLEDIEU Marie – HDR	Biologie et thérapies innovantes des cancers

PROFESSEUR AGREGE (PRAG)

PRICOT Sophie	Anglais
----------------------------	---------

PERSONNEL ASSOCIE A TEMPS PARTIEL (PAST)

SAINT-LORANT Guillaume	Pharmacie clinique
SEDILLO Patrick	Pharmacie officinale
RICHARD Estelle	Pharmacie officinale

ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE

JOURDAN Jean-Pierre

Enseignants titulaires du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

Remerciements

Aux membres du jury

Un grand merci au Pr Valérie Collot d'avoir accepté d'être la directrice de cette thèse ainsi que la présidente du jury. Vous m'avez suivi durant mes études de pharmacie et surtout durant mon Stage d'initiation à la Recherche ; stage qui initia par la suite mon parcours dans le monde de la recherche, je ne l'oublierais pas.

Merci au Dr Monique N'Diaye d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse et dont le choix pour ce jury de thèse concernant le paludisme était évident. Même si vos cours de parasitologie me font encore trembler des années après, ils ont été une base importante pour ce travail.

Merci au Pr Pierre Verhaeghe d'avoir aussi accepté de participer à ce jury. Là aussi le choix était indiqué au vu des thèmes. En espérant continuer à collaborer avec vous dans les années à venir.

Pensée pour le Pr Frédéric Fabis, prévu initialement pour être directeur de cette thèse.

A mon équipe de stage de M2

Un grand merci au Dr Céline Deraeve sans qui les travaux dont découlent cette thèse n'auraient pas pu avoir lieu. Merci pour ta sympathie, ton écoute, ton aide et ta confiance durant tout ce stage.

Merci aux Pr Heinz Gorniztka et Dr Catherine Hemmert, eux-aussi pour leur sympathie et leur aide durant ce stage.

A mes parents, ma famille

Vous avez sacrifié beaucoup de choses pour moi durant de nombreuses années et je ne saurais jamais comment vous remercier : papa, maman, merci pour tout. Votre soutien, amour, confiance et tout le reste ont été et reste un incroyable moteur pour ma réussite. Le petit garçon de CM2 qui a dit haut et fort vouloir être pharmacien à désormais bien grandi.

Merci à tout le reste de ma famille pour leur soutien continu et le nombre incalculable de : « il te reste combien d'années d'études ? » !

Ce n'est pas le sang mais tout comme : merci de tout mon coeur à Claudine mais aussi Florence, Gaëlle et Auregan pour avoir participé à faire de moi la personne que je suis. Vous avez su nourrir ma curiosité et mon goût pour la science.

A mes amis

Louis-Paul, merci pour tout ! Depuis la 2^{ème} année tu m'as accompagné dans les cours, les TPs et TDs, les soirées, les bars, les traversées de Caen à pieds le soir et tes « ça roule ! ». Tous ces souvenirs auxquels d'autres s'ajouteront sans aucun doute !

Thomas B., merci de m'avoir supporté comme binôme ; hommage à nos prises de têtes continues en TPs et en dehors !

Valentin, merci pour toutes ces discussions incroyables et ces travaux de groupes de très très grande qualité !

Arthur et Thomas L., merci pour toutes ces soirées dont les soirées cinés et tous ces échanges de mêmes incroyables.

Lisa, merci aussi pour ces soirées et à l'échange ininterrompu de tags sur des photos de chats !

Merci à l'équipe « On se brise ?! » (un petit plateau de shooters pour fêter ça ?) et aux équipes 2013-2014 et 2014-2015 de l'ATSC.

Et enfin, mention spéciale à Pierre-François. Les cinés/restos avec toi de temps en temps c'est bien mais les études supérieures avec toi ça aurait été incroyable. Bisous Rico !

Mentions finales

Je souhaite enfin remercier les personnes qui m'ont accompagnée au travers de mes différents stages de recherche : les désormais docteurs Bao Vy Lam, Yohann Berhault et Victor Babin ainsi que les Dr Silvia Stiebing et Thomas Cailly.

Remerciements aussi pour mon actuelle équipe à l'ICR de Marseille : Nicolas, Romain, Dyhia, Marion et toute la famille PCR.

Pour terminer, je remercie le Dr Corinne Launay-Lailler, son mari et toute l'équipe de sa pharmacie.

Table des matières

Table des abbréviations	1
Table des illustrations :	4
1 Introduction.....	9
2 Le paludisme : première parasitose mondiale.....	10
2.1 Le parasite : <i>Plasmodium spp.</i>	10
2.2 Le vecteur : <i>Anopheles spp.</i>	11
2.3 Le cycle de développement de <i>Plasmodium</i>	11
2.4 Physiopathologie du paludisme	12
2.4.1 L'accès palustre simple	13
2.4.2 L'accès palustre grave et le neuropaludisme.....	13
2.5 Méthodes pour le diagnostic du paludisme	14
2.6 Epidémiologie.....	14
2.6.1 Répartition.....	15
2.6.2 Nombre de cas et incidence.....	16
2.6.3 Nombre de décès et taux de mortalité	17
3 La prévention antipaludique	18
3.1 La lutte antivectorielle	18
3.1.1 Les moustiquaires imprégnées d'insecticide.....	18
3.1.2 La pulvérisation résiduelle intérieure	20
3.1.3 Autres moyens de lutte antivectorielle	21
3.2 La vaccination.....	22
3.3 La chimioprévention.....	23
4 Les traitements médicamenteux.....	24
4.1 Quinine et ses dérivés	24
4.1.1 La quinine.....	24
4.1.2 Les 4-aminoquinoléines	26
4.1.3 Les 8-aminoquinoléines	27
4.1.4 Les arylaminoalcools.....	27
4.2 La combinaison atovaquone-proguanil	29
4.3 L'association sulfadoxine-pyriméthamine	30
4.4 Antibiotiques utilisés comme antipaludiques	30
4.5 L'artémisinine et ses dérivés : révolution dans la thérapie antipaludique.....	31
4.5.1 Découverte de l'artémisinine	31
4.5.2 Généralités sur l'artémisinine.....	32
4.5.3 Dérivés d'artémisinine et ACT	33

4.6	Thérapies médicamenteuses en cours de développement.....	33
4.6.1	Molécules en phase 2 des essais cliniques	34
4.6.2	Molécules en phase I des essais cliniques	37
4.6.3	Molécules en développement préclinique	37
4.7	Nouvelles cibles prometteuses.....	38
5	<i>Plasmodium</i> , un parasite résistant à tous les médicaments sur le marché	39
5.1	<i>Pf</i> CRT et chloroquino-résistance.....	40
5.2	<i>Pf</i> MDR1 et résistance aux dérivés quinoléiques	41
5.3	Mutations dans la voie des folates et sur le cytochrome bc ₁	41
5.4	La résistance à l'artémisinine	42
5.4.1	Identification du mécanisme de la résistance	42
5.4.2	Principe du RSA et du QSA	44
5.4.3	Découverte du gène <i>Pfkelch13</i> , marqueur de la résistance à l'artémisinine	45
5.4.4	Mutation du gène <i>Pfkelch13</i> et résistance aux autres antipaludiques	47
5.4.5	Situation actuelle sur le terrain	48
6	Molécules et cibles d'intérêt contre les parasites quiescents	50
6.1	Molécules ciblant les voies protéiques en lien avec <i>Pfkelch13</i>	50
6.1.1	Inhibiteurs de PI3K	50
6.1.2	Inhibiteurs de P4K.....	51
6.2	Molécules ciblant les voies actives chez les parasites quiescents	51
6.2.1	Inhibiteurs de PI4K	51
6.2.2	La voie des isoprénoïdes	52
6.2.3	La voie des acides gras (FASII)	53
6.2.4	Les voies mitochondriales	54
6.2.5	Les voies épigénétiques.....	57
7	L'approche hybride	59
7.1	Hybrides antipaludiques développés	59
7.1.1	Basés sur l'artémisinine	60
7.1.2	Basés sur les dérivés quinoléiques	60
7.1.3	Hybrides comportant un chimiosensibilisant	61
7.2	Hybrides ciblant les parasites résistants à l'artémisinine	62
8	Travaux de stage de Master 2	63
8.1	Objectifs du stage	63
8.2	Discussion.....	64
8.2.1	Synthèse de molécules actives d'intérêt.....	64
8.2.2	Synthèse d'hybrides présentant le linker alkyl-diester.....	67
8.2.3	Synthèse d'hybrides présentant le linker diéthylèneglycol/dicarbonat	71

8.3	Résultats biologiques.....	73
8.3.1	Tests de chimiosensibilité	73
8.3.2	Tests de recrudescence	73
8.3.3	Tests QSA	74
9	Conclusion et perspectives.....	76
10	Partie expérimentale.....	78
10.1	Matériels	78
10.2	Molécules synthétisées	78
11	Bibliographie complémentaire	89
12	Annexes.....	91

Liste des annexes

- Annexe 1 : Schéma décrivant les différentes parties d'un *Plasmodium* au stade mérozoïte (Source : <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Plasmodium.png> par Jfbranch14). – Page 91
- Annexe 2 : Répartition sur le globe des différentes espèces d'*Anopheles* (Source : <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/mosquitoes/map.html>) – Page 91
- Annexe 3 : Cycle du paludisme (Source : <https://www.cdc.gov/dpdx/malaria/index.html>) – Page 92
- Annexe 4 : Tableau résumant les facteurs génétiques et environnementaux pouvant modifier directement ou indirectement la relation *Plasmodium*-Anophèle. (Source : Tripet F, Aboagye-Antwi F, Hurd H. Ecological immunology of mosquito–malaria interactions. Trends Parasitol. 2008;24(5):219 27.) – Page 92
- Annexe 5 : Evolution du taux d'incidence du paludisme au cours du temps selon trois scénarios différents (pour 1000 personnes à risque). Légende : courbe bleue : Estimations actuelles du taux d'incidence ; courbe verte : objectifs de la stratégie mondiale de lutte contre le paludisme 2016-2030⁵ ; courbe bleu ciel : tendance prévue si la tendance actuelle se poursuit ; courbe rouge : retour à l'incidence des années précédentes (pire scénario). (Source : OMS⁴) – Page 93
- Annexe 6 : Proportion de la population à risque, par pays, pouvant accéder à une moustiquaire imprégnée d'insecticide. Légende : en vert, supérieure ou égale à 80% ; en vert pâle, entre 50% et 80% ; en rose, moins de 50% ; en blanc, pas de paludisme endémique ; en gris, non applicable. (Source : OMS⁴) – Page 93
- Annexe 7 : Structures chimiques des différents insecticides (hors pyréthroïdes) utilisés dans la pulvérisation résiduelle intérieure. – Page 94

- Annexe 8 : Structures chimiques de la 22,23-dihydroavermectine B_{1a} et de la 22,23-dihydroavermectine B_{1b}, molécules englobées sous le nom d'ivermectine. – Page 94
- Annexe 9 : Tableau résumant l'avancée et la cible des différents vaccins antipaludiques en cours de développement (D'après Coelho *et al.*¹⁶) – Page 95
- Annexe 10 : Arbre décisionnel de la prise en charge du paludisme en France. (Source : https://www.vidal.fr/recommandations/1845/paludisme_traitement/prise_en_charge/) – Page 95
- Annexe 11 : Structure chimique de l'acide folique. – Page 96
- Annexe 12 : Tableau récapitulatif des ACTs disponibles sur le marché (Source : M. Oujji et al.: Parasite 2018, 25, 24) – Page 96
- Annexe 13 : Résumé des différentes activités antipaludiques pour 4 composés au stade II des essais cliniques. (D'après Ashton *et al.*³⁹) – Page 97
- Annexe 14 : Effets sur une hématie infectée par *Plasmodium* d'un traitement inhibiteur de PfATP4 (ici SJ733). *In vitro*, le développement du parasite est stoppé après 24h et une mort lente s'engage avec un maximum atteint à 96h. *In vivo*, les hématies dont l'éryptose est initiée vont être phagocytées par le système immunitaire de l'hôte. (D'après Jiménez-Díaz MB, Ebert D, Salinas Y, Pradhan A, Lehane AM, Myrand-Lapierre M-E, et al. (+)-SJ733, a clinical candidate for malaria that acts through ATP4 to induce rapid host-mediated clearance of *Plasmodium*. P Natl Acad Sci USA. 2014;111(50):E5455-62.) – Page 97
- Annexe 15 : Exemples de cibles parasitaires pouvant être ciblé par des médicaments. (Source : Kumar S, Bhardwaj TR, Prasad DN, Singh RK. Drug targets for resistant malaria: Historic to future perspectives. Biomed Pharmacother. 2018;104:8-27) – Page 98
- Annexe 16 : Tableau récapitulatif des gènes responsables des résistances aux différents antipaludiques. (Source : Haldar K, Bhattacharjee S, Safeukui I. Drug resistance in Plasmodium. Nat Rev Microbiol. 2018;16(3):156-70) – Page 98
- Annexe 17 : Evolution au cours du temps de la répartition de la chloroquinorésistance dans le monde. (Source : <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMp1403340>) – Page 99
- Annexe 18 : Répartition de trois résistances à des antipaludiques en Afrique et Asie du Sud-Est. (Source : Haldar K, Bhattacharjee S, Safeukui I. Drug resistance in Plasmodium. Nat Rev Microbiol. 2018;16(3):156-70) – Page 99
- Annexe 19 : Nuages de points représentant l'IC₅₀ de plusieurs antipaludiques d'isolats parasitaires provenant de Palin (PL) et Ratanakiri (RTK). Abréviations : AS =

artésunate ; DHA = dihydroartémisinine ; ATV = atovaquone ; DOX = Doxycycline ; MQ = Méfloquine ; CQ = Chloroquine ; PIP = Pipéraquline et QN = Quinine. (D'après Witkowski *et al.*⁶⁶) – Page 100

- Annexe 20 : Représentation schématique des domaines de la protéine *Pfkelch13* et des mutations identifiées (en rouge, mutations prouvées comme étant associées avec une résistance à l'artémisinine). (Source : M. Ouji et al.: *Parasite* 2018, 25, 24) – Page 100
- Annexe 21 Représentation schématique de la protéine *Pfkelch13* dimérisée et de son action. (PI3K = phosphatidyl-inositol 3-kinase ; Ub = ubiquitine ; uTF = unknown transcription factor). (D'après Paloque *et al.*⁴⁹) – Page 101
- Annexe 22 : Schéma représentant l'effet de la mutation de *Pfkelch13* sur le niveau de PI3P et de la résistance à l'artémisinine. (D'après Mbengué *et al.*⁷¹) – Page 101
- Annexe 23 : Voies de signalisations impactées par la mutation de la protéine *Pfkelch13*. (D'après Paloque *et al.*⁴⁹) – Page 102
- Annexe 24 : Nombre d'ACTs dans les pays d'Asie du sud-est avec un taux d'échec supérieur à 10%. (Source : OMS⁶³) – Page 102
- Annexe 25 : Voie de synthèse des acides gras. (D'après Qidwai et Khan⁸⁷) – Page 103
- Annexe 26 : Chaîne respiratoire et molécules inhibitrices chez *Plasmodium*. (Source : Goodman CD, Buchanan HD, McFadden GI. Is the Mitochondrion a Good Malaria Drug Target? *Trends Parasitol.* 2017;33(3):185-93) – Page 103
- Annexe 27 : Structures chimiques de différents inhibiteurs de lysine déméthylases. (Source : Maes T, Carceller E, Salas J, Ortega A, Buesa C. Advances in the development of histone lysine demethylase inhibitors. *Curr Opin Pharmacol.* 2015;23:52-60) – Page 104
- Annexe 28 : Classification des hybrides d'après leur mode d'interaction avec la cible, la nature du linker ou la forme des composants. (Source : Agarwal D, Gupta RD, Awasthi SK. Are Antimalarial Hybrid Molecules a Close Reality or a Distant Dream? *Antimicrob Agents Ch.* 2017;61(5):e00249-17) – Page 104
- Annexe 29 : Structures chimiques des molécules décrites dans la partie expérimentale – Page 105

Table des abréviations

ABC : *ATP binding casset*

ACT : *Artemisinin based Combined Therapy*

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADP : Adénosine Di-Phosphate

ATP : Adénosine Tri-Phosphate

ATU : Autorisation Temporaire d'Utilisation

CE₅₀ : Concentration efficace 50

CI₅₀ : Concentration Inhibitrice 50

CIRC : Centre International de Recherche contre le Cancer

DCC : N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide

DDT : Dichlorodiphényltrichloroéthane

DHFR : Dihydrofolate réductase

DHODH : Dihydroorotate déhydrogénase

DHPS : Dihydrofolate réductase

DIPEA : Diisopropyléthylamine

DMAP : 4-Diméthylaminopyridine

EDC : 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide

eEF2 : *translation elongation factor 2*

ELQ : *Endochin-Like Quinolone*

G6PD : Glucose 6-Phosphate Déshydrogénase

HAS : Haute Autorité de Santé

HAT : Histone acétyltransférase

HDAC : Histone déacétylase

HOBt : Hydroxybenzotriazole

IV : Intra-veineuse

KDAC : Lysine déacétylase

KDM : Lysine déméthylase

LCC : Laboratoire de Chimie de Coordination (Université Toulouse 3 Paul Sabatier)

MMV : *Medecines for Malaria Venture*

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

PERK : *Protein kinase R (PRK)-like Endoplasmic Reticulum Kinase*

*Pf*AKT : *Plasmodium falciparum* Protéine kinase B

*Pf*CRT : *Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter*

*Pf*EMP1 : *Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1*

*Pf*MDR : *Plasmodium falciparum multidrug resistance transporter*

*Pf*MRP : *Plasmodium falciparum multidrug resistance-associated protein*

*Pf*P4K : *Plasmodium falciparum* Protéine kinase 4

*Pf*PI3k : *Plasmodium falciparum* Phosphoinositide 3-kinase

*Pf*PI4k : *Plasmodium falciparum* Phosphatidylinositol 4-kinase

*Pf*PNP : *Plasmodium falciparum* Purine nucléoside phosphorylase

PI3P : Phosphatidylinositol-3-phosphate

PI4P : Phosphatidylinositol 4-phosphate

QSA : *Quiescent-stage Survival Assay*

Rf : Rapport frontal

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RSA : *Ring-stage Survival Assay*

TACT : *Triple Artemisinin based Combined Therapy*

TDR : Test de Diagnostic Rapide

UPR : *Unfolded Protein Response*

Table des illustrations :

Figures :

- Figure 1 : *Anopheles gambiae* femelle durant un repas sanguin (Source : Wikipédia). – Page 11
- Figure 2 : Evolution morphologique de *Plasmodium* au cours du cycle intra-érythrocytaire. (D'après Bozdech *et al.* PLoS Biol. 2003;1(1): e5.) – Page 12
- Figure 3 : A gauche, un frottis sanguin ; à droite, une goutte épaisse de sang. – Page 14
- Figure 4 : Pays touchés par du paludisme endémique en 2000 et leur statut en 2016. En rouge, un cas indigène ou plus ; en orange, aucun cas en 2018 ; en rose, aucun cas en 2017-2018 ; en bleu, au moins 3 ans depuis le dernier cas ; en vert, pas de paludisme indigène depuis 2000 ; blanc, pas de paludisme indigène ; gris, non applicable. Source : World Malaria Report 2019⁴ – Page 16
- Figure 5 : A gauche, moustiquaires imprégnées d'insecticides au-dessus de lits ; à droite, structure chimique de l'alphaméthine – Page 18
- Figure 6 : Structure chimique du piperonyl butoxide – Page 19
- Figure 7 : En haut, structure chimique de la quinoléine et sa numérotation ; en bas, structure chimique de la quinine. – Page 24
- Figure 8 : Structures chimiques de la chloroquine (à gauche) et de l'amodiaquine (à droite). – Page 26
- Figure 9 : Structure chimique de la pipéraquline – Page 27
- Figure 10 : Structure chimique de la primaquine. – Page 27
- Figure 11 : Structures chimiques de l'énantiomère (+)-(1R-2S) de la méfloquine (à gauche), de la luméfántrine (à droite) et de l'halofántrine (au centre). – Page 28
- Figure 12 : Structures chimiques de l'atovaquone (à gauche) et de l'ubiquinone (à droite). – Page 29
- Figure 13 : Structures chimiques du proguanil (à gauche) et du cycloguanil (à droite). – Page 29
- Figure 14 : Structure chimique de la sulfadoxine. – Page 30
- Figure 15 : Structure chimique de la pyriméthamine. – Page 30

- Figure 16 : Structures chimique de la clindamycine (à gauche) et de la doxycycline (à droite). – Page 31
- Figure 17 : A gauche, un plant d'*Artemisia annua* et à droite, le Pr Youyou Tu (© Nobel Media AB. Photo: A. Mahmoud) – Page 31
- Figure 18 : Structure chimique de l'artémisinine. – Page 31
- Figure 19 : Structure chimique commune des dérivés d'artémisinine. – Page 33
- Figure 20 : Structures chimiques, de la gauche vers la droite, de l'artéfénomel, de la ferroquine et du ganaplacide (en haut) et de la cipargamine, du composé DSM265 et du composé MMV048 (en bas). – Page 35
- Figure 21 : Structures chimiques (de gauche à droite) des composés P218, MMV253 et M5717. – Page 37
- Figure 22 : Structure chimique du composé MMV646. – Page 37
- Figure 23 : Courbes représentant l'évolution de la parasitémie (en % par rapport à la parasitémie initiale) au cours des heures suivant le début du traitement. D'après Dondorp *et al.*⁶² – Page 42
- Figure 24 : Nuages de points représentant le % de parasites viables 66h après une exposition pendant 6h à 700 nM de DHA de différents isolats parasitaires. D'après Witkowski *et al.*⁶⁶ – Page 43
- Figure 25 : Principe du test QSA. A : conditions employées durant le test. B : Exemples de résultats possibles avec 3 différentes molécules partenaires. Abréviations : ART = artémisinine ; pD = partner drug. – Page 44
- Figure 26 : Nuages de points mettant en relation le polymorphisme de *Pfkelch13* et le taux de survie suivant un test RSA. D'après Arieu *et al.*⁶⁸ – Page 45
- Figure 27 : Evolution du retour à la parasitémie initiale en fonction du temps après traitement à l'amodiaquine chez une souche non-résistante à l'artémisinine (trait plein) et chez une souche résistante (pointillés). D'après Ménard *et al.*⁷⁵ – Page 48
- Figure 28 : Proportions de souches parasitaires possédant une mutation non-synonyme du gène *Pfkelch13*, par pays et régions du monde. D'après Ménard *et al.*⁷⁷ – Page 48
- Figure 29 : Structures chimiques de la wortmannine (à gauche) et du composé LY294002 (à droite). – Page 50

- Figure 30 : En haut, structure chimique du composé GSK2606414. En bas, influence de GSK2606414 sur le temps de retour à la parasitémie initiale ; d'après Axten *et al.*⁸⁰ – Page 51
- Figure 31 : Structures chimiques des composés KDU691 (à gauche) et BQR695 (à droite). – Page 52
- Figure 32 : Structure chimique du composé KDU691. – Page 52
- Figure 33 : A gauche, IC₅₀ du composé KDU691 chez des parasites au stade anneau et chez des parasites induits en quiescence par un pré-traitement à l'artémisinine (DP-rings). A droite, croissance relative de parasites pré-traités à l'artémisinine puis exposés 24h au composé KDU691 par rapport à un témoin DMSO. D'après Dembélé *et al.*⁸³ – Page 52
- Figure 34 : A gauche, structure chimique de la fluridone. A droite, évolution du retour à la parasitémie initiale pour différentes conditions : noir, DHA seule pendant 2 jours ; rouge, DHA 2 jours puis acide abscissique ; vert, DHA 2 jours puis acide gibérellique et bleu DHA 2 jours puis fluridone 2 jours. D'après Duvalsaint et Kyle.⁸⁵ – Page 53
- Figure 35 : Structure chimique du hit de Wang *et al.*⁸⁶ – Page 53
- Figure 36 : en haut, structure chimique du triclosan ; en bas, test QSA avec le triclosan, d'après Chen *et al.*⁸¹ – Page 54
- Figure 37 : Temps de retour à la parasitémie initiale pour différentes conditions (DHA = Dihydroartémisinine ; ATQ = atovaquone). D'après Peatey *et al.*⁸⁸ – Page 54
- Figure 38 : Structures chimiques des composés GW844520 et GSK932121 (en haut) et du nouveau hit de Bueno *et al.*⁹² (en bas). – Page 55
- Figure 39 : En haut, structures chimiques de l'ELQ-300 (à gauche) et ELQ-400 (à droite) ; en bas, structures chimiques de l'endochine (à gauche) et du hit de Neelarapu *et al.*⁹⁶ – Page 56
- Figure 40 : En haut, structures chimiques du vorinostat (à gauche) et du panobinostat (à droite) ; en bas, structures chimiques du belinostat (à gauche) et de la romidepsine (à droite). – Page 57
- Figure 41 : Structure générale des composés d'Ontoria *et al.*¹⁰⁰ – Page 58

- Figure 42 : Structures chimiques de la trioxaquine PA1103 (à gauche) et d'une trioxaferroquine (à droite). – Page 60
- Figure 43 : Structures chimiques illustrant les travaux de Singh *et al.*¹⁰⁸ (à gauche) et Manohar *et al.*¹⁰⁹ (à droite). – Page 61
- Figure 44 : Structure chimique d'un primacène. – Page 61
- Figure 45 : Exemple de molécule réalisée par Chavain *et al.*¹¹¹ – Page 61
- Figure 46 : Concept d'hybrides visant à cibler les parasites résistants à l'artémisinine. – Page 62
- Figure 47 : A gauche, linker de type alkyl-ester ; à droite, linker de type diéthylène glycol-carbonate. – Page 64
- Figure 48 : Structure chimique du clopidol. – Page 65
- Figure 49 : Structure chimique du TEMPO. – Page 66

Schémas :

- Schéma 1 : Schéma résumant la voie de dégradation/détoxification de l'hémoglobine humaine par *Plasmodium*. – Page 25
- Schéma 2 : Molécules à l'origine de la ferroquine (à droite) : la chloroquine et le ferrocène. – Page 60
- Schéma 3 : En haut, structure chimique du linker disulfure-carbonate ; en bas, impuretés résultant du phénomène de trans-thioétherification.- Page 64
- Schéma 4 : Schéma rétrosynthétique de GW844520 – Page 64
- Schéma 5 : Voie de synthèse du synthon a, **3**. – Page 65
- Schéma 6 : Schéma réactionnel du couplage de Chan-Lam. – Page 65
- Schéma 7 : Voie de synthèse du synthon b, **5**. – Page 66
- Schéma 8 : Couplage de Suzuki-Miyaura permettant la synthèse de **I**. – Page 66
- Schéma 9 : Voie de synthèse de **II**, SAHA. – Page 67
- Schéma 10 : Effets observés suite à une hausse de l'exposition au triclosan chez l'Homme. D'après Weatherly et Gosse.¹¹⁷ – Page 68
- Schéma 11 : Voie de synthèse de l'ester de triclosan **9**. – Page 69

- Schéma 12 : Schéma de synthèse des hybrides en série triclosan-linker alkyl diester. – Page 69
- Schéma 13 : Action de l'hydrure de sodium sur le clopidol. – Page 70
- Schéma 14 : Voie de synthèse de l'ester de SAHA. – Page 71
- Schéma 15 : Schéma de synthèse du carbonate de triclosan **14**. – Page 72
- Schéma 16 : Conditions utilisées pour greffer le SAHA sur le linker diéthylène glycol et résultats. – Page 72

Tableaux :

- Tableau 1 : Objectifs de l'OMS dans la lutte antipaludique jusqu'en 2030.⁵ – Page 15
- Tableau 2 : Nombres estimés de cas et de décès du paludisme dans le monde entre 2010 et 2016. D'après l'OMS⁴ – Page 16
- Tableau 3 : Date de mise sur le marché et de mise en évidence des premières résistances pour quelques molécules antipaludiques. D'après Paloque *et al.*⁴⁹ – Page 39
- Tableaux 4 : Valeurs d'IC₅₀ de différentes molécules sur la souche F32-TEM – Page 73
- Tableau 5 : Résultats des tests de recrudescence sur plusieurs molécules. (Moyenne ± SEM : moyenne ± erreur type de la moyenne concernant la différence des jours de recrudescence.) – Page 74
- Tableau 6 : Résultats des tests QSA pour la molécule **I**. – Page 74
- Tableau 7 : Résultats des tests QSA pour l'hybride **III**. – Page 75

1 Introduction

Le paludisme est la parasitose la plus mortelle avec une estimation de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) à 405 000 décès en 2018. Au cours du XX^{ème} siècle, l'introduction progressive de diverses molécules thérapeutiques via des campagnes d'éradications couplées à l'utilisation d'insecticides (pour éliminer les anophèles, vecteurs de la maladie) a permis de diminuer cette mortalité. Cependant, *Plasmodium*, le parasite responsable du paludisme a su développer des résistances à ces molécules.

Alors que la mortalité progressait durant les années 1990, l'introduction de l'artémisinine et de ses dérivés au début des années 2000 révolutionna la lutte antipaludique grâce à l'efficacité de ces composés. Ces nouvelles molécules en association avec de nouvelles approches dans la lutte antivectorielle ont permis d'arriver aux résultats actuels. Or, le parasite a de nouveau évolué et les souches résistantes à l'artémisinine et ses dérivés sont aujourd'hui majoritaires en Asie du Sud-Est, zone géographique connue pour avoir vu émerger d'autres résistances dans le passé. Une dissémination de celle-ci en Afrique serait dramatique sur ce continent déjà le plus touché par le paludisme.

Malgré la découverte et le développement continu de nouvelles molécules antipaludiques, aucune ne semble être en mesure de pouvoir éliminer cette nouvelle résistance qui met en difficulté les objectifs de l'OMS en termes de réduction du nombre de cas et de décès dans le monde. Identifiée par des biologistes du Laboratoire de Chimie de Coordination (LCC) de Toulouse en 2010, elle est due à une mutation génétique (gène *Pfkelch13*) permettant aux parasites de se mettre en quiescence et ainsi ignorer les effets du traitement. Les voies protéiques entourant la mutation sont encore peu connues mais des voies métaboliques sont encore actives chez ces parasites quiescents.

Cette thèse s'inscrit dans les travaux d'un stage de Master 2 réalisé au sein du LCC de Janvier à Juillet 2018. Le but de ce stage était la synthèse de molécules hybrides capables de cibler ces voies métaboliques encore actives chez les parasites quiescents afin de pouvoir éliminer ces parasites. Dans cette thèse sera au préalable abordé des généralités concernant le paludisme (parasite, vecteur, manifestations cliniques, données épidémiologiques). Les moyens de lutte préventive et l'arsenal thérapeutique à disposition seront décrits afin de comprendre comment se passe la lutte antipaludique dans les zones endémiques. Une fois les résistances aux divers antipaludiques expliquées, la résistance à l'artémisinine sera détaillée et des molécules d'intérêt contre celle-ci évoquées. Enfin les travaux réalisés au cours du stage et leurs résultats seront discutés pour découler sur une conclusion.

2 Le paludisme : première parasitose mondiale

Une parasitose est définie comme étant une « infection ou infestation par un parasite, qui peut être cliniquement symptomatique (maladie parasitaire) ou inapparente (parasitose latente) ». ¹ On peut diviser ces parasitoses en deux classes : les ectoparasitoses, où le parasite reste à l'extérieur de l'hôte (ex : morsure de tique) et les endoparasitoses, où le parasite pénètre à l'intérieur de l'hôte (ex : le paludisme).

Le terme malaria est celui principalement utilisé à l'étranger pour parler du paludisme. Ce terme dérive de l'italien *mal'aria* qui signifie « mauvais air ».

2.1 Le parasite : *Plasmodium spp.*

Le paludisme est dû aux parasites du genre *Plasmodium*. Ces parasites sont des protozoaires (ils sont composés d'une seule cellule, Annexe 1). Les *Plasmodium* appartiennent :

- A l'embranchement des *Apicomplexa*, rassemblant les protozoaires comportant un organite appelé l'apicoplaste ainsi qu'un complexe apical qui permet au parasite de pénétrer dans une cellule. Les parasites au sein de cet embranchement possèdent une reproduction sexuée (gamogonie) et asexuée (schyzogonie),
- A l'ordre des *Euccocidea*, comportant des protozoaires monoxènes ou dixènes (1 ou 2 hôtes nécessaires au développement) parasitant les cellules épithéliales ou les hématies,
- Au sous-ordre des *Haemosporina*, où les protozoaires sont dixènes, parasites des hématies et transmis par des diptères,
- A la famille des *Plasmodidae*.

5 espèces de *Plasmodium* sont responsables du paludisme chez l'Homme : *Plasmodium falciparum*, *vivax*, *malariae*, *ovale* et *knowlesi*. Une autre espèce, *P. berghei*, est importante car elle est responsable du paludisme chez le rongeur et est utilisée comme modèle dans la recherche préclinique contre le paludisme.

¹ Larousse. (Page consultée le 25/09/18). Définition : parasitose, [en ligne]. <http://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/parasitose/58031>

2.2 Le vecteur : *Anopheles spp.*

Le vecteur désigne le responsable de la transmission du parasite. Dans le cas du paludisme, ce vecteur est un moustique (diptère) du genre *Anophèles*. Ce genre rassemble plus de 450 espèces de moustiques réparti sur l'ensemble du globe (Annexe 2) dont un quart est capable de transmettre le paludisme à l'Homme. L'espèce la plus connue capable de cette transmission est *Anopheles gambiae* (Figure 1).



Figure 1 : *Anopheles gambiae* femelle durant un repas sanguin (Source : Wikipédia).

Le cycle de vie des anophèles (et des autres moustiques) possède quatre stades :

- Stade zytotique : une fois pondu dans l'eau, l'œuf va mettre quelques jours avant d'éclore et donner une larve.
- Stade larvaire : la larve vit et s'alimente sous la surface de l'eau pendant au minimum 5 jours. Elle respire au travers de celle-ci à l'aide de stigmates.
- Stade nymphal : enfermée au sein d'une puppe, la larve va se transformer pendant quelques jours.
- Stade imagal : stade adulte.

La transmission à l'Homme est uniquement due aux anophèles femelles puisque ce sont unique elles qui se nourrissent de sang chez les moustiques. Outre le paludisme, les anophèles sont aussi notamment responsables de la transmission de la filaire de Bancroft ou encore de certaines fièvres hémorragiques. Les piqûres interviennent la nuit et elles sont non prurigineuses (sans démangeaisons). De plus, le vol de l'anophèle est silencieux.

2.3 Le cycle de développement de *Plasmodium*

Le cycle de *Plasmodium* (Annexe 3) se répartit entre le moustique et l'Homme. Le parasite est transmis à l'Homme par l'anophèle, *via* la piqûre, sous forme de sporozoïtes. Le cycle au sein de l'Homme comporte deux parties : une phase exo-érythrocytaire ou hépatocytaire et une phase intra-érythrocytaire.

Lors de la première phase, les sporozoïtes vont rejoindre le foie et infecter des hépatocytes pour s'y multiplier, se développer sous forme de schizontes à l'origine des formes dites mérozoïtes et qui sont libérés dans le sang, lors de l'éclatement des hépatocytes. Chez *P.*

vivax et *ovale*, ces formes hépatocytaires sont capables de survivre plusieurs mois au sein des hépatocytes.

Vient ainsi la seconde phase (Figure 2) où ces mérozoïtes vont infecter les hématies et devenir des trophozoïtes pour ensuite soit entrer dans un cycle de multiplication asexuée (trophozoïtes → schizontes → mérozoïtes) soit entrer dans un stade de différenciation sexuée (trophozoïte → gamétocyte mâle ou femelle). Ces deux voies provoquent une hémolyse. Les parasites se développent au sein des hématies car ils trouvent au sein de celles-ci l'hémoglobine (la protéine de transport de l'oxygène) qu'ils dégradent afin de produire de l'énergie ainsi que les acides aminés qui leur sont requis.

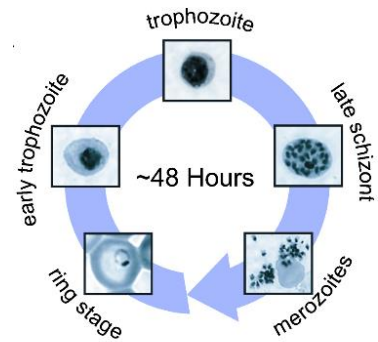


Figure 2 : Evolution morphologique de *Plasmodium* au cours du cycle intra-érythrocytaire. (D'après Bozdech *et al.* PLoS Biol. 2003;1(1): e5.)

Les gamétocytes peuvent ensuite être absorbés, lors d'un repas sanguin par un autre moustique *Anopheles* femelle au sein duquel, après maturation des gamètes mâles et femelles et la fécondation, plusieurs stades conduiront à la production de nouveaux sporozoïtes.

Des études ont révélé que le *Plasmodium* était capable de modifier le comportement d'un anophèle parasite. Lacroix *et al.* ont ainsi montré que l'anophèle est plus susceptible de piquer un enfant comportant des gamétocytes que ceux non infectés ou bien comportant les stades asexués dans le sang.² Ce comportement facilite la transmission de l'Homme au moustique. De nombreux autres paramètres (Annexe 4) semblent intervenir dans la relation anophèle-*Plasmodium* que ce soit du au parasite ou bien à l'environnement. On a notamment une hausse du nombre de piqûre chez les anophèles parasités ainsi qu'une durée de vie allongée à cause d'un cycle de reproduction réduit.³

2.4 Physiopathologie du paludisme

Suite à une piqûre par un anophèle parasite, la phase hépatique est asymptomatique et possède une durée en général de 7 à 15 jours chez *P. falciparum* et qui varie chez les autres espèces de *Plasmodium*. Les premiers symptômes du paludisme se développent lors de l'invasion des hématies par les mérozoïtes mais ne sont pas très spécifiques : fièvre, frissons, maux de têtes ou encore fatigue généralisée. Le tableau de symptômes peut aussi faire penser à une gastro-entérite.

² Lacroix R, Mukabana WR, Gouagna LC, Koella JC. Malaria Infection Increases Attractiveness of Humans to Mosquitoes. PLoS Biol. 2005;3(9):e298.

³ Tripet F, Aboagye-Antwi F, Hurd H. Ecological immunology of mosquito-malaria interactions. Trends Parasitol. 2008;24(5):219-27.

2.4.1 L'accès palustre simple

Les premiers phénomènes hémolytiques accompagnant la libération de nouveaux mérozoïtes sont initialement asynchrones pendant plusieurs jours. Un isolat (un trophozoïte) finit par prendre le dessus ce qui donne des hémolyses synchrones. Ces hémolyses s'accompagnent :

- D'une anémie hémolytique régénérative et possiblement d'une thrombopénie,
- D'une splénomégalie due à la présence de débris cellulaires dans le sang,
- D'un possible ictère à cause de la bilirubine libérée dans le sang,
- Mais surtout d'un épisode fébrile qui a pour origine la libération de substances pyrogènes et principalement l'hémozoïne (produit de dégradation de l'hémoglobine par le *Plasmodium*).

Cet épisode fébrile démarre par une sensation de froid puis de frissons accompagnés par de la fièvre et enfin par se termine par des sueurs. Les hémolyses finissant par devenir synchrones, les fièvres le deviennent aussi. On parle de fièvres tierces pour celles se répétant tous les 2 jours (chez *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. ovale*) et de fièvres quarts pour celles survenant tous les 3 jours (chez *P. malariae*).

Avec le temps, un équilibre s'installe entre le système immunitaire de l'hôte et le parasite permettant une atténuation voire une disparition de ces épisodes fébriles : on parle d'état de prémunition. Ils peuvent cependant revenir avec une nouvelle piqûre infestée. Cette immunité n'est pas obtenable par les jeunes enfants, le système immunitaire étant encore en développement. Certaines personnes sont résistantes au paludisme notamment les personnes drépanocytaires ou déficitaires en Glucose 6-Phosphate Déshydrogénase (G6PD), maladie appelée favisme.

2.4.2 L'accès palustre grave et le neuropaludisme

Un accès palustre devient grave lorsqu'une fois les hématies infestées par le parasite, celles-ci vont exprimer des protéines d'adhésion et vont pouvoir commencer à s'agglutiner dans les capillaires des organes et notamment le cerveau. On parle alors de neuropaludisme. Cette agglutination va à la fois provoquer une hypoxie des tissus en aval mais aussi, à cause de la libération de molécules pro-inflammatoires lors de l'adhésion, provoquer une réaction inflammatoire locale.

On assiste alors à une défaillance multi-viscérale avec des troubles neurologiques (convulsions, coma), rénaux (insuffisance rénale), pulmonaires (risque d'œdème pulmonaire)

etc... Cette forme de paludisme est mortelle en 2 à 3 jours sans traitement (et peut même descendre à plusieurs heures chez l'enfant).

Le même mécanisme peut être dangereux chez la femme enceinte puisque cette agglutination peut avoir lieu au sein du placenta et provoquer une hypoxie fœtale.

Chez les jeunes enfants, on peut être en présence d'un paludisme viscéral évolutif. L'organisme est alors débordé par les différentes formes parasitaires qui ont champs libre pour pouvoir proliférer au sein de l'organisme.

Ces accès palustres graves ne sont retrouvés que chez une seule espèce de *Plasmodium* : *P. falciparum*. Cette espèce est donc la seule mortelle pour l'Homme : la prise en charge d'un accès palustre sera donc différente si celui-ci est provoqué ou non par *P. falciparum*.

2.5 Méthodes pour le diagnostic du paludisme

Outre l'examen clinique visant à rechercher les signes décrits précédemment, plusieurs méthodes pour poser un diagnostic de paludisme existent. A l'hôpital, le diagnostic sera établi par microscope à l'aide d'un frottis sanguin et d'une goutte épaisse de sang (Figure 3). Le premier sert à identifier l'espèce de *Plasmodium* tandis que la seconde permet de repérer facilement la présence de parasites.

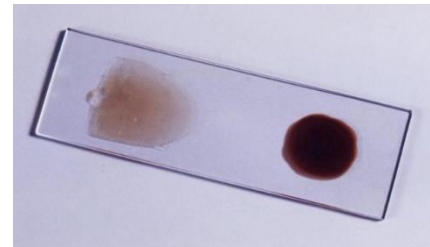


Figure 3 : A gauche, un frottis sanguin ; à droite, une goutte épaisse de sang.

Des méthodes de terrains (ou bien en seconde intention après échec du frottis et de la goutte épaisse) sont aussi utilisées. Ces tests de diagnostic rapide du paludisme (TDR) sont des tests basés sur la détection d'antigènes parasitaires à partir d'une goutte de sang du patient. Cependant ces techniques restent moins sensibles que celle décrite précédemment.

Enfin il existe des techniques moléculaires pour détecter la présence de *Plasmodium*. On peut doser les protéines plasmodiales. On peut aussi effectuer une sérologie mais seulement dans les de paludisme viscéral évolutif ou comme diagnostic rétrospectif après traitement. Enfin, les méthodes PCR (*Polymerase Chain Reaction*) sont aussi utilisées mais cantonnées au domaine de la recherche.

2.6 Epidémiologie

Les données épidémiologiques concernant le paludisme sont mises à jour chaque année par l'OMS via son rapport annuel sur le paludisme qui paraît en fin d'année civile. Ce rapport

compile notamment les données épidémiologiques obtenues auprès de chaque « région OMS », découpage géographique du monde en plusieurs régions. Les chiffres présentés sont ceux du rapport 2019 décrivant les chiffres de 2018.⁴

En 2015, l'OMS a établi des objectifs jusqu'en 2030 pour la lutte contre le paludisme dans le monde ; avec des objectifs intermédiaires pour les années 2020 et 2025. Ces objectifs sont rassemblés dans le document « Stratégie technique mondiale de lutte contre le paludisme 2016-2030 ».⁵

Tableau 1 : Objectifs de l'OMS dans la lutte antipaludique jusqu'en 2030.⁵

Objectifs	2020	2025	2030
Réduire le taux de mortalité global du paludisme par rapport à 2015	D'au moins 40%	D'au moins 75%	D'au moins 90%
Réduire l'incidence globale du paludisme par rapport à 2015			
Éliminer le paludisme dans des pays où celui-ci était endémique en 2015	Dans au moins 10 pays	Dans au moins 20 pays	Dans au moins 35 pays
Prévenir le retour du paludisme dans des pays où celui-ci a disparu	Retour évité		

2.6.1 Répartition

Le paludisme est retrouvé dans une majorité des pays du globe, surtout ceux de l'hémisphère sud. Il était aussi présent auparavant dans les pays européens y compris la France métropolitaine ainsi qu'en Amérique du Nord. En Europe, sa disparition démarre à partir du XIX^{ème} siècle et le début de l'assèchement massif des marais (lieu de vie de prédilection pour les moustiques) pour en faire des terres cultivables. Mais le paludisme n'a disparu de la France métropolitaine que depuis les années 1960, de la Réunion depuis 1979 et reste encore présent à Mayotte et en Guyane.

En Afrique, *P. falciparum* est le principal responsable de la maladie tandis que *P. vivax* est prépondérant en Amérique du Sud et en Asie. Ceci explique pourquoi la mortalité décrite ci-après est en quasi-totalité retrouvée sur le continent africain.

⁴ Organisation Mondiale de la Santé. (Page consultée le 13/01/20). World Malaria Report 2019, [pdf]. Disponible à l'adresse <https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1262394/retrieve>

⁵ Organisation Mondiale de la Santé. (Page consultée le 28/09/18). Stratégie technique mondiale de lutte contre le paludisme 2016-2030, [pdf en ligne]. http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/176720/9789242564990_fre.pdf?sequence=1

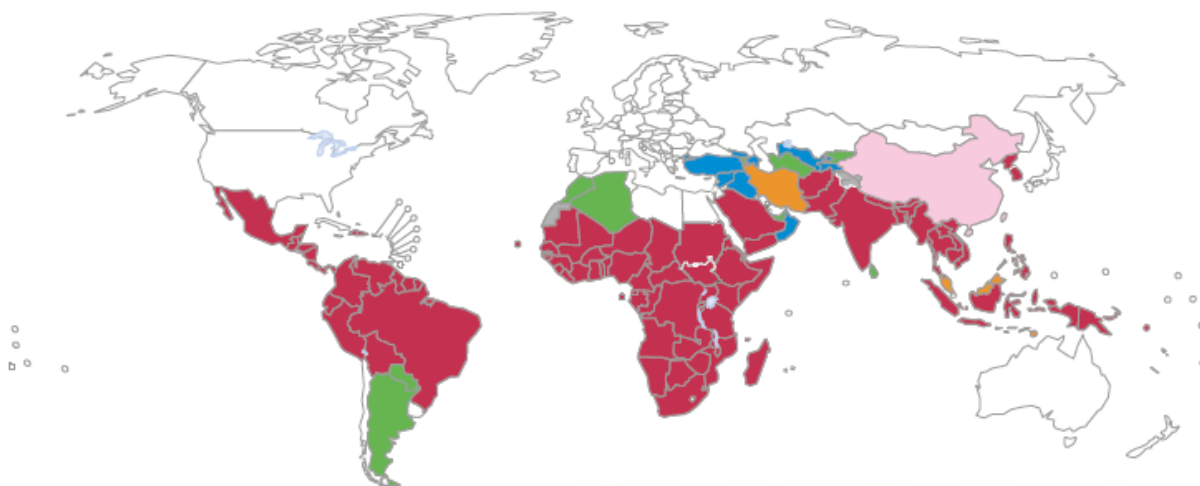


Figure 4 : Pays touchés par du paludisme endémique en 2000 et leur statut en 2016. En rouge, un cas indigène ou plus ; en orange, aucun cas en 2018 ; en rose, aucun cas en 2017-2018 ; en bleu, au moins 3 ans depuis le dernier cas ; en vert, pas de paludisme indigène depuis 2000 ; blanc, pas de paludisme indigène ; gris, non applicable. Source : World Malaria Report 2019⁴

2.6.2 Nombre de cas et incidence

Tableau 2 : Nombres estimés de cas et de décès du paludisme dans le monde entre 2010 et 2016. D’après l’OMS⁴

	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Nombre de cas (en millions)	251	241	234	224	217	219	227	231	228
Nombre de décès (en milliers)	585	536	508	477	463	446	427	416	405

Le tableau 2 expose les chiffres de l’OMS sur le nombre de cas de paludisme dans le monde entre 2010 et 2018. Ces chiffres sont passés de 251 millions de cas en 2010 à 228 millions en 2016. Ce chiffre était de 262 millions en 2000.⁶ Cependant on peut observer un retour à la hausse de ce nombre de cas depuis 2015. Finalement par rapport à l’an 2000, ce chiffre est en baisse de 13%. Pour l’année 2018, 93% des cas de paludisme ont eu lieu en Afrique.

En termes d’incidence (nombre de nouveaux cas par an pour une population donnée), celle-ci baisse aussi sur la période 2010-2018. Dans le monde, ce chiffre est passé de 71,1 à 57,4 (-25%) pour 1000 habitants à risque par an sur cette période. En Afrique, elle est passée de 294,4 à 229,3 cas (-22%). Mais l’objectif affiché par l’OMS de -40% pour 2020 par rapport à 2015 (Tableau 1) est inatteignable au regard de la stagnation de l’incidence depuis 2014 et les objectifs suivants semblent peu probables (Annexe 5).

⁶ Organisation Mondiale de la Santé. (Page consultée le 28/09/18). Rapport sur le paludisme dans le monde 2015 – résumé, [pdf en ligne]. http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/205422/WHO_HTM_GMP_2016.2_fre.pdf?sequence=1

2.6.3 Nombre de décès et taux de mortalité

En 2019, l'OMS estime que le paludisme a tué 405 000 personnes dans le monde pour l'année 2018. Ce chiffre, à la différence du nombre de cas qui stagne après être légèrement remonté, est en constante diminution : -30% depuis l'année 2010, -48% depuis l'an 2000.⁶ L'Afrique concentre sur son territoire 94% de ces décès. 272 000 (67%) de ces décès concernent des enfants de moins de 5 ans.

Le taux de mortalité, qui représente ici le rapport entre le nombre de morts dus au paludisme sur un an et une population donnée, est estimé par l'OMS en 2018 à 10,2 pour 100 000 personnes à risque dans le monde. Ce nombre atteint 41 pour l'Afrique. Là encore, l'objectif établi pour 2020 est inatteignable au regard de la tendance des dernières années.

3 La prévention antipaludique

Afin d'atteindre les différents objectifs, précédemment énoncés, pour 2030, l'OMS compte s'appuyer évidemment sur les différentes thérapies médicamenteuses disponibles contre le paludisme mais aussi sur les moyens de préventions qui aujourd'hui ont su faire leurs preuves et participe majoritairement à la réduction du nombre de cas.

3.1 La lutte antivectorielle

Sous ce terme est rassemblé tous les moyens permettant de lutter contre le vecteur du paludisme, l'anophèle, et ainsi diminuer la propagation du paludisme auprès des populations.

3.1.1 Les moustiquaires imprégnées d'insecticide

Il s'agit du moyen de lutte antivectorielle le plus utilisé. C'est une moustiquaire destinée à être placée au-dessus du lit afin de protéger la personne des anophèles (Figure 5). Ce moyen est doublement efficace puisque les anophèles piquent à partir du début de soirée et de plus l'insecticide présent sur la moustiquaire va tuer le nuisible.

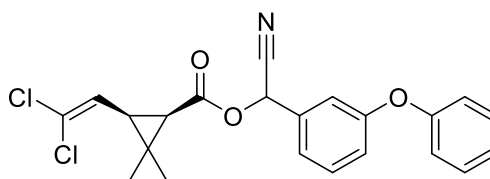


Figure 5 : A gauche, moustiquaires imprégnées d'insecticides au-dessus de lits ; à droite, structure chimique de l'alphaméthine

A l'heure actuelle, seuls les insecticides de la classe des pyréthrinoïdes sont autorisés pour l'utilisation sur des moustiquaires. 6 composés sont recommandés : l'alphaméthine (Figure 5), la deltaméthrine, la λ -cyhalothrine, l'étofenprox, la bifenthrine et la cyfluthrine. Il s'agit de composés de synthèse dérivant des pyréthrine d'origine naturelle. Ils possèdent de nombreux avantages : non toxiques pour les humains ainsi que la plupart des autres mammifères, efficaces à partir de faibles doses, coûts de fabrication faibles. Ces composés sont assez stables dans la durée à condition de ne pas trop les exposer à la lumière ainsi que d'éviter le lavage répété des moustiquaires. Ces composés agissent en paralysant le système nerveux de la cible.

L'impact de l'introduction de ces moustiquaires est énorme puisqu'il est estimé qu'elles sont à 68% responsables de la diminution du nombre de cas de paludisme entre 2000 et 2015 en Afrique.⁷

Un nouveau type de moustiquaire est ensuite apparu : les moustiquaires imprégnées d'insecticides longue durée. L'insecticide est incorporé au sein des fibres de la moustiquaire. Cela permet d'avoir une moustiquaire pouvant durer jusqu'à trois ans avec la même efficacité, pouvant être lavée. Elles ont un meilleur rapport coût efficacité puisqu'elles ne nécessitent pas de retraitement comme une moustiquaire classique.

Cependant l'utilisation d'une seule classe d'insecticide a fini par sélectionner une résistance à cette classe chez les anophèles. En 2015, cette résistance est rapportée dans quasiment 30 pays africains selon l'OMS mais elle est présente sur tous les continents à l'exception de l'Europe.⁶ Celle-ci met en péril les progrès obtenus avec les moustiquaires.

En attendant d'utiliser ou de développer de nouveaux insecticides, la combinaison des pyréthrinoïdes avec du piperonyl butoxide apparait comme la solution la plus rapide à ce problème de résistance. Cette molécule possède un effet synergique avec les pyréthrinoïdes : elle n'a pas elle-même d'effet insecticide mais elle majore l'effet des pyréthrinoïdes. Le piperonyl butoxide va inhiber le cytochrome P450, enzyme responsable de l'élimination des pyréthrinoïdes. Cet effet synergique semble efficace sur les anophèles résistants aux pyréthrinoïdes comme le montre cette étude de Protopopoff *et al.*⁸ Cette étude dans laquelle ils comparent l'efficacité des moustiquaires longue durée avec ou sans piperonyl butoxide montre une réduction d'environ 75% du taux d'inoculation entomologique sur un an dans les lieux disposant d'une moustiquaire avec piperonyl par rapport à ceux sans. Ce taux correspond comme le nombre de piqûres transmettant le paludisme reçu par un individu sur une période donnée. Mais à l'heure actuelle, l'OMS n'a pas encore émis d'avis clair quant à l'utilisation du piperonyl butoxide.

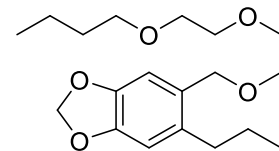


Figure 6 : Structure chimique du piperonyl butoxide

Les moustiquaires sont le principal moyen de lutte antivectorielle en Afrique et sont désormais répandues sur toutes les zones du continent touchées par le paludisme (Annexe 6). L'OMS estime que 54% de la population à risque d'Afrique sub-saharienne dort sous une moustiquaire imprégnée.⁴

⁷Bhatt S, Weiss DJ, Cameron E, Bisanzio D, Mappin B, Dalrymple U, et al. The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. *Nature*. 2015;526(7572):207-11.

⁸ Protopopoff N, Masha JF, Lukole E, Charlwood JD, Wright A, Mwalimu CD, et al. Effectiveness of a long-lasting piperonyl butoxide-treated insecticidal net and indoor residual spray interventions, separately and together, against malaria transmitted by pyrethroid-resistant mosquitoes: a cluster, randomised controlled, two-by-two factorial design trial. *Lancet*. 2018;391(10130):1577-88.

3.1.2 La pulvérisation résiduelle intérieure

Cette technique est définie par l'OMS comme étant «l'application d'un insecticide résiduel longue durée sur les potentielles surfaces de repos du vecteur du paludisme comme les murs intérieurs, les corniches et les plafonds de toutes les maisons ou structures (y compris les abris pour les animaux domestiques) où le vecteur pourra venir en contact avec l'insecticide».⁹ Ces insecticides peuvent être répulsifs, irritants ou mortels pour le vecteur. Ils doivent répondre à plusieurs critères évidents comme l'efficacité, la stabilité, un risque faible en matière de toxicité, un coût acceptable et enfin ils doivent être acceptés par les populations (potentielles odeurs, traces sur les surfaces aspergées).

L'OMS recommande 4 classes d'insecticides pour la pulvérisation. Parmi celles-ci, on retrouve les pyréthroides précédemment évoqués. Les 3 autres classes (Annexe 7) sont :

- Les carbamates (bendiocarbe et propoxure) : ce sont des inhibiteurs réversibles de l'acétylcholine estérase,
- Les organochlorés (dichlorodiphényltrichloroéthane ou DDT) : le DDT est un agoniste des canaux sodiques neuronaux et va provoquer des spasmes chez l'insecte à cause d'une ouverture continu de ces canaux,
- Les organophosphorés (malathion, fenitrothion et pyrimiphos-méthyl) : ce sont des inhibiteurs irréversibles de l'acétylcholine estérase.

Certains de ces pesticides sont controversés. Le DDT a été très largement utilisé à partir du milieu du XXème siècle : il a notamment contribué à l'éradication du paludisme en Amérique du Nord et en Europe. Même si ses effets sur l'environnement ont été décriés dès les années 60, son interdiction en usage agricole ne démarre qu'en 1970. Aujourd'hui, son usage est limité pour la lutte contre plusieurs maladies parasitaires dans les zones tropicales. En 2011, l'OMS a statué qu'elle suspendrait l'utilisation du DDT lorsqu'une alternative similaire en termes d'efficacité et de coût sera proposée.¹⁰ En 2015, le Centre International de Recherche contre le Cancer (CIRC) a classé le DDT comme cancérigène probable pour l'Homme (catégorie 2A).¹¹

⁹ Organisation Mondiale de la Santé. (Page consultée le 02/10/18). Indoor Residual Spraying. [pdf en ligne]. http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/177242/9789241508940_eng.pdf?jsessionid=D4D6382710FA6AEFE37B43CEB0FD70C9?s equence=1

¹⁰ Organisation Mondiale de la Santé. (Page consultée le 02/10/18). The use of DDT in malaria vector control. [pdf en ligne]. http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/69945/WHO_HTM_GMP_2011_eng.pdf?sequence=1

¹¹ 1. DDT, Lindane, and 2,4-D / IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (2015: Lyon, France)
2. Loomis D, Guyton K, Grosse Y, El Ghissasi F, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, et al. Carcinogenicity of lindane, DDT, and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Lancet Oncol.* 2015;16(8):891-2.

On peut aussi évoquer le malathion qui est interdit dans l'Union Européenne depuis décembre 2008. Il est très toxique pour de nombreux insectes y compris les insectes « utiles » comme les abeilles. De plus, le CIRC l'a classé en 2015 dans la catégorie des substances probablement cancérigènes pour l'Homme (catégorie 2A).¹²

Mais comme avec les pyréthrinoïdes, les anophèles ont développé des résistances à ces trois autres classes d'insecticides. On observe ainsi une baisse de l'utilisation de cette technique au niveau mondial : l'OMS estime que le nombre de personnes protégées entre 2010 et 2016 est passé de 180 à 100 millions avec une forte baisse en Afrique (de 10% à 4.7% des personnes à risque).⁴

3.1.3 Autres moyens de lutte antivectorielle

D'autres méthodes à diverses échelles peuvent être mises en place. Au niveau individuel, on peut envisager l'utilisation de répulsifs/insecticides à usage topique ou bien pour appliquer sur les vêtements. Cependant ces méthodes semblent être peu fiables d'après Maia *et al.*¹³ Mais ces méthodes ne doivent pas être complètement écartées notamment pour les touristes.

On peut aussi viser les lieux de développement des moustiques. Eliminer les larves permet de réduire la quantité de moustiques avant même qu'ils ne puissent transmettre le paludisme. Cela passe d'abord par l'élimination des eaux stagnantes proches des habitations comme les trous dans les sols ou bien tout ce qui pourrait servir de récipient à de l'eau pour une durée permettant le développement de moustiques. Quand cela se révèle impossible, on peut utiliser des méthodes chimiques pour supprimer les larves.

A une échelle locale, on peut réaliser des pulvérisations d'insecticides dans l'air mais cette technique doit se limiter aux périodes d'épidémie et doit être réalisée lorsque le vecteur est le plus actif pour maximiser son efficacité. Une méthode plus récente est le lâcher de mâles stériles qui permet à court terme de réduire la population de moustiques. Mais cette technique reste limitée à une certaine zone autour du lâcher.¹⁴

Enfin une dernière méthode serait de rendre toxique le sang humain pour les moustiques.¹⁵ L'OMS recommande déjà l'utilisation de primaquine à faible dose, une molécule

¹² 1. Some organophosphate insecticides and herbicides/ IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (2015: Lyon, France)

2. Guyton KZ, Loomis D, Grosse Y, El Ghissassi F, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, et al. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. *Lancet Oncol.* 2015;16(5):490-1.

¹³ Maia MF, Kliner M, Richardson M, Lengeler C, Moore SJ. Mosquito repellents for malaria prevention. *Cochrane Db Syst Rev.* 2018.

¹⁴ Wikipedia.org. (Page consultée le 04/10/18). Technique de l'insecte stérile, [en ligne].

https://fr.wikipedia.org/wiki/Technique_de_l%27insecte_st%C3%A9rile

¹⁵ Rosier F. Contre le paludisme, rendre le sang humain toxique pour les moustiques *Le Monde* 2018.

https://www.lemonde.fr/afrique/article/2018/04/22/contre-le-paludisme-rendre-le-sang-humain-toxique-pour-les-moustiques_5289032_3212.html?xtmc=paludisme_la_guerre_d_usure&xtcr=10

active sur le stade hépatocytaire, afin d'empêcher le développement du paludisme dans le vecteur. Cette fois, il s'agirait d'employer de l'ivermectine (Annexe 8) afin de tuer les moustiques. Cette molécule possède peu d'effets secondaires et pourrait même être utilisée sur le bétail. L'OMS ne s'est pas encore prononcée sur une utilisation plus importante de cette méthode.

3.2 La vaccination

La découverte d'un vaccin capable d'empêcher le déroulement du cycle de vie du paludisme est un objectif depuis longtemps recherché. Mais le développement d'un vaccin pour un parasite est quelque chose de très compliqué.

Plusieurs stratégies vaccinales sont explorées par les chercheurs :

- Vacciner contre le stade hépatocytaire et ainsi limiter l'infestation du foie et permettre d'éliminer les hépatocytes touchés.
- Vacciner contre le stade érythrocytaire avec comme objectif, non pas de stopper les cycles d'hémolyses, mais de diminuer le nombre de parasites tout en permettant le développement de l'immunité contre le parasite avec un risque diminué.
- Développer un vaccin bloqueur de transmission en provoquant la production d'antigènes par l'organisme qui vont cibler les stades du parasite au sein du moustique. Cette approche en soi ne donne aucune immunité contre le paludisme mais permet de stopper la transmission du parasite.

Au deuxième semestre 2017, 9 vaccins sont en développement¹⁶ (Annexe 9) : 3 en phase préclinique, 5 en phase I et 1 en phase II. Un unique vaccin est parvenu à atteindre le marché (phase IV) : le RTS,S/AS01E (spécialité MOSQUIRIX ®). Il est développé depuis les années 1980 par les laboratoires GSK. C'est un vaccin ciblant la phase érythrocytaire. L'étude de phase III a permis de montrer que ce vaccin diminue le risque d'infection chez 56% des enfants vaccinés entre 5 et 17 mois et 31% chez ceux vaccinés entre 6 et 12 semaines.¹⁷ Ces résultats encourageants s'accompagnent d'effets secondaires limités (convulsions suite aux fièvres et quelques cas de méningites). L'OMS s'est positionnée en faveur d'une utilisation à plus grand échelle du vaccin¹⁸ après que le vaccin ait été approuvé par l'Union Européenne après

¹⁶ Coelho CH, Doritchamou JYA, Zaidi I, Duffy PE. Advances in malaria vaccine development: report from the 2017 malaria vaccine symposium. *npj Vaccines*. 2017;2(1).

¹⁷ Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. *Lancet*. 2015;386(9988):31-45.

¹⁸ Organisation Mondiale de la santé. (Page consultée le 04/10/18). Relevé épidémiologique hebdomadaire, [pdf en ligne]. <http://www.who.int/wer/2016/wer9104.pdf> 04/10

évaluation en 2015.¹⁹ Une version pilote du vaccin a été déployé dans trois pays africains (Ghana, Kenya et Malawi) depuis Avril 2019.²⁰

3.3 La chimioprévention

A mi-chemin entre prévention et thérapie médicamenteuse, on retrouve la chimioprévention qui permet de limiter le risque d'infection et de mortalité infantile associée via l'utilisation de médicaments à dose thérapeutiques. La présence continue dans le sang de molécules actives contre le paludisme confèrera une protection limitée dans le temps pour la personne. Trois chimiopréventions sont décrites par l'OMS, pour une application dans les zones endémiques, utilisant principalement l'association sulfaméthoxine/pyriméthamine :

- La chimioprévention du paludisme saisonnier : l'administration de traitements chez les enfants dans les zones où la transmission du paludisme est très liée aux saisons (saison des pluies).
- Le traitement préventif intermittent chez les nourrissons : trois doses de médicaments durant la première année de vie.
- Traitement préventif intermittent du paludisme pour les femmes enceintes.

La chimioprévention doit aussi être utilisée pour les touristes se préparant à réaliser un voyage dans des zones à risques. Santé Publique France, en lien avec la Haute Autorité de Santé (HAS), publie des recommandations sur ce sujet.²¹ Celles-ci vont varier selon la durée du séjour, la période, le pays, l'âge des personnes etc...

¹⁹ Agence Européenne du Médicament. (Page consultée le 04/10/18). Avis concernant l'utilisation du Mosquirix, [pdf en ligne]. https://www.ema.europa.eu/documents/medicine-outside-eu/chmp-summary-positive-opinion-mosquirix_en.pdf

²⁰ Adepoju P. RTS,S malaria vaccine pilots in three African countries. Lancet. 2019;393(10182):1685.

²¹ Institut de Veille Sanitaire. (Page consultée le 06/10/18). Recommandations sanitaires pour les voyageurs, 2017 (à l'attention des professionnels de santé), [pdf en ligne]. http://opac.invs.sante.fr/doc_num.php?explnum_id=10785

4 Les traitements médicamenteux

Le paludisme est une parasitose pour laquelle l'arsenal thérapeutique est très étoffé. Différentes classes thérapeutiques ciblant différentes cibles/stades du parasite sont disponibles. Le médicament utilisé dépend de l'espèce impliquée et chez *P. falciparum*, de l'apparition d'un accès simple ou grave (cf. Physiopathologie du paludisme et Annexe 10). Cependant il faut tenir compte aussi des spécificités locales (ou du lieu de séjour s'il s'agit d'un touriste) pour prendre en compte de potentielles résistances médicamenteuses et ainsi délivrer le traitement le plus efficace. Cette adaptation est nécessaire car aujourd'hui le parasite a développé des résistances à toutes ces thérapies.

4.1 Quinine et ses dérivés

Dans cette famille, on va retrouver la quinine ainsi que ses dérivés 4-aminoquinoléines, 8-aminoquinoléines et arylaminoalcools.

4.1.1 La quinine

La quinine est un alcaloïde d'origine naturelle comportant un noyau quinoléine substitué en position 4 par une chaîne latérale comportant une fonction alcool et un noyau azoté quinuclidine et en position 6 par un groupement méthoxy (Figure 7). Elle est extraite de l'écorce du quinquina et est l'alcaloïde majoritaire de la plante. Le quinquina (genre *cinchona*) est un arbre d'Amérique du Sud de la famille des *Rubiaceae*. Il pousse dans la Cordillère des Andes, côté est, où il profite de l'altitude et des fortes précipitations. L'activité de l'écorce de quinquina contre la fièvre paludique est connue depuis longtemps par les Incas lorsque les conquistadors débarquent en Amérique du Sud. Les jésuites en font l'observation et ramènent l'écorce, utilisée sous forme de poudre, en Europe où elle sera appelée « poudre des Jésuites » par la suite. Deux pharmaciens français, Pelletier et Cavantou, isolent la quinine en 1817, mettant à jour le principe actif de cette écorce qui sera alors employé au cours du XIX^{ème} siècle comme médicament contre le paludisme. La difficulté de produire la quinine en quantité suffisante va pousser à rechercher des dérivés synthétiques. La synthèse énantiosélective de la quinine ne sera réalisée qu'en 2001.²²

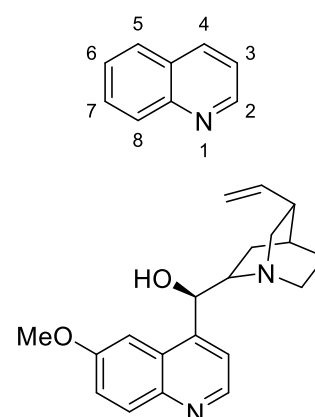


Figure 7 : En haut, structure chimique de la quinoléine et sa numérotation ; en bas, structure chimique de la quinine.

²² Stork G, Niu D, Fujimoto A, Kofit ER, Balkovec JM, Tata JR, et al. The First Stereoselective Total Synthesis of Quinine. *J Am Chem Soc.* 2001;123(14):3239-42.

La quinine est aujourd'hui principalement utilisée, *per os* (en 3^{ème} intention) ou en intraveineuse (IV), dans le traitement du paludisme à *P. falciparum* ne présentant pas dans l'immédiat des signes de gravité (spécialité QUINIMAX ®). Le mécanisme d'action n'a pas été clairement établi mais l'hypothèse qui fait consensus (en lien avec les études portant principalement sur la chloroquine, un de ses dérivés) est qu'elle agit sur le mécanisme de détoxification de l'hème par le parasite (Schéma 1). Le parasite, en phase érythrocytaire, réside au sein des hématies pour se nourrir. Au sein de la vacuole parasitaire, l'hémoglobine est dégradée d'un côté en acides aminés, utiles au parasite pour son métabolisme et de l'autre, l'hème (une porphyrine comportant un atome de fer) est libéré. Cet hème est toxique pour le parasite qui le transforme en ferroprotoporphyrine IX puis ferriprotoporphyrine IX. Ces porphyrines vont ensuite être polymérisées par une hème polymérase en hémozoïne, métabolite non toxique pour le parasite. La quinine et les dérivés 4-aminoquinoléines et arylaminoalcools inhiberaient cet hème polymérase entraînant l'accumulation de métabolites toxiques via la formation de complexes avec les métabolites de l'hème.²³ Une autre protéine impliquée dans cette polymérisation, l'*Histidine-Rich Protein II* est inhibée par la chloroquine.²⁴ Ces complexes toxiques pour le parasite n'étant plus éliminés, le parasite finit par mourir à cause de l'accumulation de ceux-ci. Ces composés sont donc uniquement actifs sur le stade érythrocytaire de la maladie.

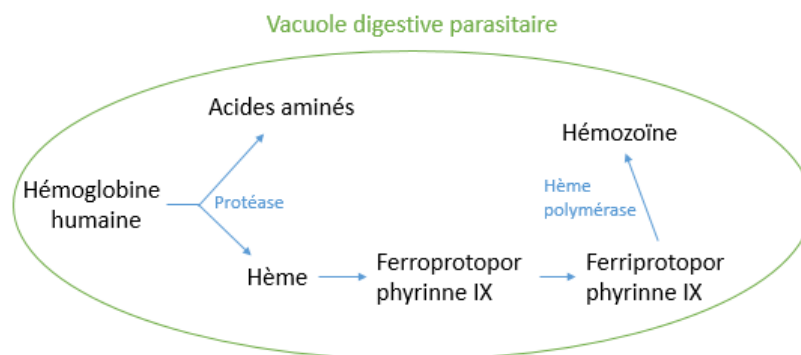


Schéma 1 : Schéma résumant la voie de dégradation/détoxification de l'hémoglobine humaine par *Plasmodium*.

L'an dernier, Dziekan *et al.*²⁵ ont découvert via une méthode thermique d'analyse des interactions molécule-protéine que la quinine, et dans une moindre mesure la méfloquine, a pour cible la purine nucléoside phosphorylase (*PfPNP*), une protéine impliquée dans le recyclage des bases purines. Bien qu'il s'agisse de la première cible protéique clairement

²³ Slater AFG, Cerami A. Inhibition by chloroquine of a novel haem polymerase enzyme activity in malaria trophozoites. *Nature*. 1992;355(6356):167-9.

²⁴ Sullivan DJ, Gluzman IY, Goldberg DE. Plasmodium Hemozoin Formation Mediated by Histidine-Rich Proteins. *Science*. 1996;271(5246):219-22.

²⁵ Dziekan JM, Yu H, Chen D, Dai L, Wirjanata G, Larsson A, et al. Identifying purine nucleoside phosphorylase as the target of quinine using cellular thermal shift assay. *Sci Transl Med*. 2019;11(473):eaau3174.

identifiée pour la quinine, les auteurs précisent qu'il s'agit d'une des voies métaboliques touchées parmi les nombreuses perturbées par cette molécule.

La quinine doit être utilisée avec précaution car elle possède un index thérapeutique étroit. A hautes doses, elle provoque le cinchonisme.²⁶ Ce syndrome, de mécanisme inconnu, est caractérisé par des accouphènes, une baisse de l'audition, vertiges, céphalées etc...

4.1.2 Les 4-aminoquinoléines

Cette classe regroupe les dérivés de la quinine comportant un noyau quinoléine substitué en position 4 (Figure 7). Trois molécules de cette classe sont utilisées : la chloroquine, l'amodiaquine (Figure 8) et la pipéraquline. Ces molécules ont le même mécanisme supposé que la quinine.

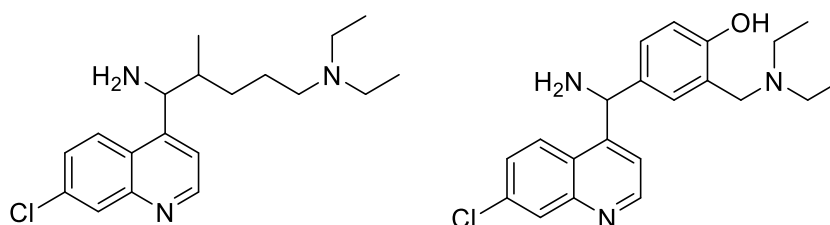


Figure 8 : Structures chimiques de la chloroquine (à gauche) et de l'amodiaquine (à droite).

La chloroquine (spécialité NIVAQUINE ®) est le premier médicament de synthèse majeur contre le paludisme. Elle est découverte en 1934 par le scientifique Hans Andersag chez l'entreprise allemande Bayer. Mise à l'écart pendant 10 ans car jugée trop toxique, la molécule montre une efficacité inédite dans des essais cliniques américains (les USA recherchant un médicament antipaludique pour appuyer leurs troupes dans la guerre du Pacifique face au Japon). Elle est mise sur le marché en 1946 et sera, avec le DDT, l'outil amenant l'éradication du paludisme en Amérique du Nord et en Europe. Contrairement à la quinine, le cycle quinoléine est substitué par un chlore, la fonction alcool est remplacée par une amine primaire et le noyau quinuclidine est remplacé par une amine tertiaire substituée par deux groupements éthyl. La chloroquine est aujourd'hui utilisée *per os* en première intention dans le traitement du paludisme n'étant pas dû à *P. falciparum*. Ses effets moyennement immunosuppresseurs font qu'elle aussi utilisée dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde et du lupus érythémateux.

L'amodiaquine a été développé en 1948. Elle est aujourd'hui utilisée en association avec l'artésunate (CAMOQUIN ®) dans le traitement, *per os*, de l'accès simple du paludisme dû à *P. falciparum* et *vivax* (mais reste efficace sur toutes les espèces). Elle est aussi utilisée avec

²⁶ Dictionnaire en ligne de l'Académie de Médecine. (Page consultée le 06/10/18). Définition du cinchonisme, [en ligne]. <http://dictionnaire.academie-medecine.fr/index.php?q=cinchonisme>

l'association pyriméthamine/sulfadoxine dans la chimioprévention du paludisme saisonnier (cf. 3.3 La chimioprévention).

La pipéraquline (Figure 9) est une bisquinoléine. Les deux noyaux sont substitués en position 4 par une pipérazine, toutes les deux reliées par une chaîne carbonée, et en position 7 par un atome de chlore. Elle est uniquement utilisée en association avec la dihydroartémisinine, ou artémamol (spécialité EURARTESIM®) dans le traitement du paludisme à *P. falciparum* et *P. vivax* principalement.

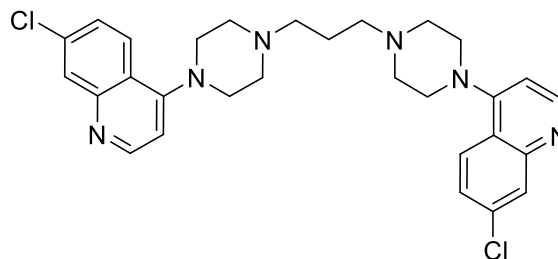


Figure 9 : Structure chimique de la pipéraquline

4.1.3 Les 8-aminoquinoléines

Pour cette classe, la substitution du noyau quinoléine est en position 8 (Figure 7). Une seule molécule de cette classe est commercialisée : la primaquine (Figure 10). Son noyau quinoléine est substitué par un groupement méthoxy et sa chaîne aminocarbonée reste proche de celle de la chloroquine. Cette

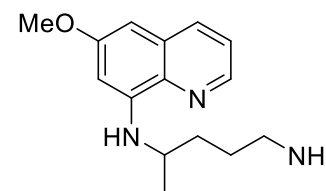


Figure 10 : Structure chimique de la primaquine.

molécule est active contre le stade hépatocytaire du paludisme. Son mécanisme d'action n'est pas encore connu mais ses métabolites hépatiques seraient des espèces toxiques intracellulaires, capables de perturber la mitochondrie parasitaire et ainsi bloquer la production d'énergie du parasite conduisant à sa mort.²⁷ Cette molécule est aussi toxique sur les stades sexués du parasite. Ses effets font qu'elle est employée dans le traitement dit « radical » du paludisme à *P. vivax* et *ovale*. Ces deux espèces sont celles présentant la plus forte réminiscence hépatique provoquant la réapparition de la maladie après des semaines ou plus si les formes intra-hépatocytaires ne sont pas éliminées. N'ayant pas d'activité sur les formes érythrocytaires, elle n'est jamais employée seule lors d'un traitement. Son principal effet toxique est l'apparition d'hémolyse toxique chez les personnes atteintes de favisme. En France, elle est uniquement disponible par le biais d'une Autorisation Temporaire d'Utilisation (ATU) nominative.

4.1.4 Les arylaminoalcools

Les arylaminoalcools sont des molécules comportant un noyau aromatique (quinoléine ou non) substitué par une chaîne comportant une fonction alcool et amine. Trois molécules répondent à cette description : la méfloquine, la luméfantine et l'halofantrine (Figure 11). Elles possèdent un mécanisme d'action (supposé) similaire à la quinine.

²⁷ Drugbank. (Page consultée le 26/03/20). Primaquine, [en ligne]. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01087>

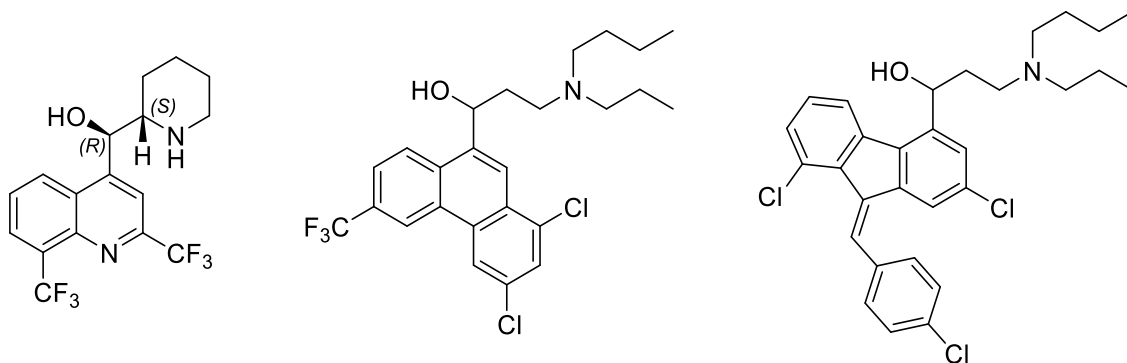


Figure 11 : Structures chimiques de l'énantiomère (+)-(1R-2S) de la méfloquine (à gauche), de la luméfántrine (à droite) et de l'halofántrine (au centre).

La méfloquine (spécialité LARIAM®) possède un noyau quinoléine substitué par deux groupements fluorométhyle et la chaîne aminocarbonée est cyclique contrairement aux précédentes molécules. Elle est utilisée en association avec l'artésunate dans le traitement de l'accès simple palustre. Elle est aussi utilisée en chimioprévention chez les touristes. Son principal effet secondaire est l'apparition de troubles neurologiques (anxiété, dépression, tendances suicidaires etc...) qui sont capables de durer longtemps après l'arrêt du traitement. Ces effets secondaires potentiellement graves a pour origine l'asymétrie de la molécule. Le composé est retrouvé dans le médicament avec un mélange de deux énantiomères (parmi 4 possibles) : l'énantiomère (+)-(1R-2S) possède l'activité antimalariale tandis que l'énantiomère (-)-(1S-2R) est capable de se lier à des récepteurs à l'adénosine dans le système nerveux central.²⁸

L'halofantrine (spécialité HALFAN®, supprimé du marché en France depuis 2016) est une molécule comportant un noyau phénanthrène mais qui est cependant proche structuralement de la chloroquine via sa chaîne latérale. Elle est utilisée dans le traitement du paludisme en cas d'intolérance à la méfloquine. Elle se retrouve à ce niveau dans l'ordre de traitement car son principal effet secondaire est la toxicité cardiaque. L'halofantrine est responsable d'arythmies cardiaque par allongement de l'espace QT.

La luméfántrine possède elle un noyau de type fluorène substitué par un parachlorobenzidène et la même chaîne aminocarbonée que l'halofántrine. La luméfántrine est uniquement utilisée en association avec l'arthéméthér (spécialités COARTEM® et RIAMET®) dans le traitement du paludisme à *P. falciparum* et *vivax* principalement.

²⁸ Drugbank. (Page consultée le 26/03/20). Mefloquine, [en ligne]. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00358>

4.2 La combinaison atovaquone-proguanil

L'atovaquone est une hydroxy-1,4-napthoquinone possédant une analogie structurale avec les ubiquinones (Figure 12). Celles-ci sont des co-facteurs des enzymes impliquées dans la chaîne respiratoire, au sein des mitochondries,

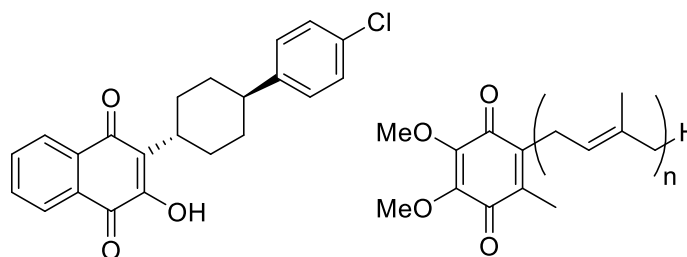


Figure 12 : Structures chimique de l'atovaquone (à gauche) et de l'ubiquinone (à droite).

où elles assurent le transport des électrons. Chez *Plasmodium*, l'atovaquone inhibe ce transport d'électrons en se fixant au niveau du site de fixation des ubiquinones du cytochrome bc₁. Cette inhibition provoque une perte du potentiel membranaire de la mitochondrie qui entraîne une inhibition de la synthèse d'adénosine triphosphate (ATP) et par conséquent des acides nucléiques. L'atovaquone est utilisée en monothérapie dans le traitement de la pneumonie à *Pneumocystis* (spécialité WELLVONE®).

Le proguanil est un biguanide substitué d'un côté par un parachlorophényl et de l'autre par un isopropyl. Le proguanil est une prodrogue métabolisée par le foie en

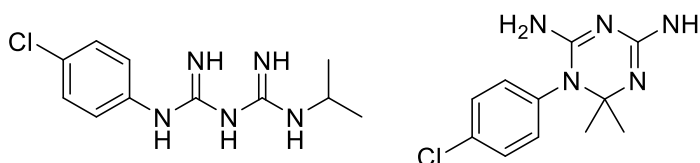


Figure 13 : Structures chimique du proguanil (à gauche) et du cycloguanil (à droite).

cycloguanil. Ce cycloguanil est similaire à la partie aromatique de l'acide folique (Annexe 11). Il va inhiber le passage de l'acide dihydrofolique en acide tétrahydrofolique en se liant à la dihydrofolate réductase (DHFR). L'acide tétrahydrofolique est un coenzyme primordial dans la synthèse *de novo* des bases purines ce qui provoque un arrêt de la croissance du parasite. Le proguanil est utilisée en chimioprévention du paludisme avec la chloroquine (spécialité PALUDRINE® et SAVARINE®).

L'association atovaquone-proguanil (spécialité MALARONE®) est singulière parmi les traitements disponibles contre le paludisme puisque l'on assiste à un effet synergique en associant ces deux composés. Outre l'effet propre de l'atovaquone et du cycloguanil, le proguanil a un effet permettant de réduire la dose d'atovaquone requise pour perturber la membrane mitochondriale.²⁹ Cette association est principalement utilisée dans la chimioprévention du paludisme.

²⁹ Srivastava IK, Vaidya AB. A Mechanism for the Synergistic Antimalarial Action of Atovaquone and Proguanil. *Antimicrob Agents Ch.* 1999;43:6.

4.3 L'association sulfadoxine-pyriméthamine

La sulfadoxine (Figure 14) est une molécule de la classe des sulfamides. Elle dérive des sulfamides anti-bactériens, premiers antibiotiques à avoir été développés. Elle possède le même mécanisme d'action : c'est un analogue de l'acide para-aminobenzoïque. Les sulfamides inhibent la dihydroptéroate synthase (DHPS) et par conséquent inhibent la synthèse de l'acide dihydrofolique. Les conséquences vont être les mêmes que pour le cycloguanil : arrêt de la synthèse *de novo* des bases purines et donc arrêt du développement parasitaire. L'apparition de troubles dermatologiques doit entraîner un arrêt immédiat du traitement car les sulfamides peuvent provoquer les syndromes de Stevens-Johnson et de Lyell.

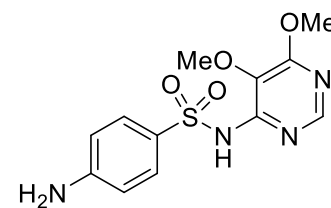


Figure 14 : Structure chimique de la sulfadoxine.

La pyriméthamine (Figure 15) est une molécule constituée d'un cycle pyrimidine substitué par deux fonctions amines, un groupement ethyl et un parachlorophényl. La molécule est très proche structurellement du cycloguanil (Figure 13) et donc possède le même mécanisme d'action : inhibition de la dihydrofolate reductase (DHFR). La molécule seule (spécialité MALOCIDE ®) est employée dans le traitement de la toxoplasmose.

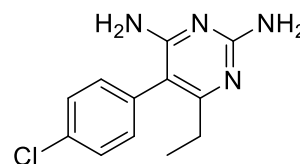


Figure 15 : Structure chimique de la pyriméthamine.

L'association des deux molécules (spécialité FANSIDAR ®) est aujourd'hui un outil important dans la chimioprévention (cf.3.3 La chimioprévention).

4.4 Antibiotiques utilisés comme antipaludiques

Deux antibiotiques sont employés comme antipaludiques (Figure 16). La clindamycine est un antibiotique de la classe des lincosamides. Elle agit par inhibition de la sous-unité ribosomale 50S provoquant une inhibition de la synthèse de peptides. La doxycycline est un antibiotique de la classe des tétracyclines. Elle inhibe elle aussi la synthèse de protéines mais en inhibant la sous-unité ribosomale 30S. Ces deux molécules ne font que ralentir la croissance parasitaire et possèdent un effet retardé, c'est pourquoi elles ne sont pas utilisées seules dans le traitement du paludisme mais en association avec la quinine ou l'artésunate.

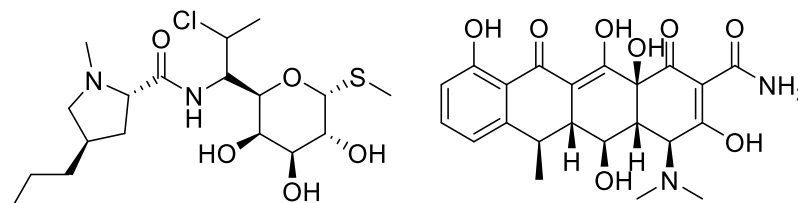


Figure 16 : Structures chimique de la clindamycine (à gauche) et de la doxycycline (à droite).

4.5 L'artémisinine et ses dérivés : révolution dans la thérapie antipaludique

L'artémisinine est une molécule antipaludique d'origine naturelle découverte dans les années 1970 par le Pr. Youyou Tu (Figure 17). Elle est extraite à partir de l'armoise annuelle (*Artemisia annua*, *qinghao* en mandarin). Cette plante de la famille des *Asteraceae* est une plante herbacée retrouvée en Chine mais aussi en Europe et Amérique du Nord.



Figure 17 : A gauche, un plant d'*Artemisia annua* et à droite, le Pr Youyou Tu (© Nobel Media AB. Photo: A. Mahmoud)

4.5.1 Découverte de l'artémisinine

À la fin des années 1960, la Chine décide de mettre en place un programme de recherche pour découvrir de nouveaux antipaludiques afin d'aider le Vietnam communiste dans sa guerre contre les États-Unis. En effet, la chloroquinorésistance était déjà répandue à l'époque. Du côté américain, les mêmes efforts conduisirent à la découverte de la méfloquine (Figure 11).

L'équipe du Pr. Tu basa ses recherches sur des milliers d'herbes utilisées en médecine traditionnelle chinoise. 640 recettes furent retenues pour avoir potentiellement des effets antipaludiques et une majorité furent testées. Les premiers extraits provenant de l'armoise annuelle ne se révélèrent pas prometteur cependant le Pr. Tu eu l'intuition de modifier le protocole d'extraction. Une fois clairement établi, le protocole permit d'obtenir un extrait capable d'éliminer toute parasitémie chez la souris en

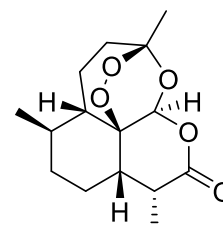


Figure 18 : Structure chimique de l'artémisinine.

1971. Des expériences visant à caractériser la molécule active (Figure 18) sont effectuées et le résultat est publié en 1979.³⁰

Peu employée une fois découverte, des dérivés de la molécule furent développés. La molécule et ses dérivés commencent à gagner en intérêt à partir du début des années 2000 à cause de :

- L'aggravation des résistances aux autres thérapies dans les zones endémiques.
- Le développement par le laboratoire Novartis de la combinaison artéméther/luméfantrine (spécialités COARTEM® et RIAMET®)
- Une très grande efficacité, y compris sur les parasites résistants à d'autres antipaludiques.

L'OMS engage alors un processus d'utilisation massive de l'artémisine et de ses dérivés ainsi que leur association avec d'autres antipaludiques : les thérapies combinées à base d'artémisinine (*Artemisinin based Combined Therapies* en anglais ou ACT). En 2006, l'OMS appelle à bannir l'utilisation de ces molécules sous la forme de monothérapies afin de réduire l'apparition de résistances.³¹

L'impact de l'introduction de cette nouvelle classe de molécules a été immense. Bhatt *et al.*⁷ estiment que les ACT ont contribué à hauteur de 20% pour la réduction de la prévalence du paludisme en Afrique entre 2000 et 2015. Cette découverte valut au Pr Tu de recevoir le Prix Nobel de médecine 2015 au côté de William Campbell et Satoshi Omura, ces derniers ayant découvert une thérapie contre les nématodes.

4.5.2 Généralités sur l'artémisinine

L'artémisinine (Figure 18) est une lactone sesquiterpénique possédant un pont endoperoxyde. La rupture homolytique du pont peroxyde conduit à la formation de radicaux libres. Cette rupture est réalisée à l'aide du fer ferreux de l'hème de l'hémoglobine dégradée par le parasite. Ces radicaux vont interférer avec de nombreuses cibles au sein du parasite.³² Le métabolite actif de l'artémisinine est la dihydroartémisinine.

³⁰Qinghaosu Antimalarial Coordinating Research Group. (1979). *Chin Med J (Engl.)* 12, 811–816.

³¹ Organisation Mondiale de la Santé. (Page consultée le 10/10/18). Retrait des monothérapies à base d'artémisinine par voie orale, [en ligne]. http://www.who.int/malaria/areas/treatment/withdrawal_of_oral_artemisinin_based_monotherapies/fr/

³²Wang J, Zhang C-J, Chia WN, Loh CCY, Li Z, Lee YM, et al. Haem-activated promiscuous targeting of artemisinin in *Plasmodium falciparum*. *Nat Commun.* 2015;6(1).

La molécule garde encore un vif intérêt en chimie thérapeutique où elle est notamment étudiée à des fins anticancéreuses.³³

4.5.3 Dérivés d'artémisinine et ACT

Trois molécules sur le marché dérivent de l'artémisinine : l'artésunate (R = OCOCH₂CH₂CO₂H), l'artéméther (R = OCH₃) et la dihydroartémisinine (appelé aussi arténimol, R = OH) (Figure 19). Ces trois dérivés possèdent le même mécanisme d'action précédemment décrit que l'artémisinine.

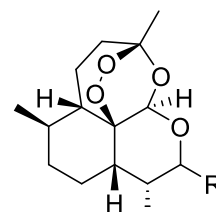


Figure 19 : Structure chimique commune des dérivés d'artémisinine.

L'artésunate est l'hémisuccinate d'artémisinine. Une fois au sein de l'organisme, il est rapidement métabolisé en dihydroartémisinine. Il est employé en monothérapie mais uniquement à l'hôpital, en IV, dans le traitement d'urgence de l'accès palustre grave. Il est employé dans des ACT avec la combinaison sulfadoxine/pyriméthamine, la méfloquine, l'amodiaquine ou la pyronaridine (un antipaludique non utilisé en dehors de cette association).

L'artéméther, une fois dans l'organisme, est lui aussi métabolisé en dihydroartémisinine. Il est utilisé en combinaison avec la luméfántrine.

La dihydroartémisinine est utilisée en association avec la pipéraquline.

Les ACT (Annexe 12) constituent aujourd'hui les traitements les plus efficaces dans la lutte contre le paludisme. Cette utilisation combinée avec d'autres antipaludiques permet :

- De limiter de l'apparition de résistances aux dérivés d'artémisinine.
- De diminuer l'impact des résistances existantes aux molécules partenaires.
- De proposer une bithérapie en limitant les problèmes de compliances que peuvent avoir les « vraies » bithérapies.

4.6 Thérapies médicamenteuses en cours de développement

De nombreux nouveaux traitements sont à l'heure actuelle dans le parcours vers la mise sur le marché. Les fonds employés pour la recherche de nouveaux médicaments entre 2010 et 2015 est estimé à 1265 millions de dollars.⁴ Une des principales organisations qui participe depuis 20 ans à la recherche dans le domaine du paludisme est *Medecines for Malaria Venture* (MMV). Cette association à but non-lucratif est un partenariat pour le développement de projets

³³ 1. Wong YK, Xu C, Karesh KA, He Y, Lin Q, Wong WSF, et al. Artemisinin as an anticancer drug: Recent advances in target profiling and mechanisms of action. *Med Res Rev.* 2017;37(6):1492-517.

2. Abba ML, Patil N, Leupold JH, Saeed MEM, Efferth T, Allgayer H. Prevention of carcinogenesis and metastasis by Artemisinin-type drugs. *Cancer Lett.* 2018;429:11-8.

aussi bien des traitements, des vaccins ou des tests diagnostics contre le paludisme. Elle agit comme intermédiaire entre des partenaires publics (principalement les laboratoires académiques) et privés (entreprises pharmaceutiques, mécènes, etc...).³⁴

Concernant les molécules antipaludiques, les projets capables de devenir candidat-médicament doivent répondre à un ou plusieurs critères précis³⁵ et notamment:

- Une activité sur toutes les souches résistantes avec une dose, unique, prédite chez l'adulte de l'ordre de 100 mg,
- Etre capable de tuer les hypnozoïtes (stade lattant hépatocytaire) en une dose unique mais tout en étant moins toxiques que les 8-aminoquinoléines,
- Bloquer la transmission du paludisme soit via un effet gamétocytocide (qui tue les gamétocytes au sein du vecteur, de préférence avec une dose aux alentours de 100 mg chez l'adulte) ou par effet endectocide (qui tue le vecteur)
- D'être chémoprotectrice (protéger une personne allant dans une zone de paludisme endémique afin d'éviter qu'elle n'attrape le paludisme) via destruction des schyzontes hépatiques.

Les molécules décrites dans la suite de cette partie répondent à un ou plusieurs de ces critères et figurent au sein du portfolio de molécules antipaludiques en cours de développement par MMV.³⁶

4.6.1 Molécules en phase 2 des essais cliniques

La phase II des essais cliniques est la première phase où le traitement est administré chez des personnes malades.

³⁴ Medecines for Malaria Venture. (Page consultée le 18/03/20). The PDP model , [en ligne]. <https://www.mmv.org/partnering/pdp-model>

³⁵ Burrows JN, Duparc S, Gutteridge WE, Hooft van Huijsdijnen R, Kaszubska W, Macintyre F, et al. New developments in anti-malarial target candidate and product profiles. *Malar J.* 2017;16(1).

³⁶ Medecines for Malaria Venture. (Page consultée le 18/03/20). MMV-supported projects, [en ligne]. <https://www.mmv.org/research-development/mmv-supported-projects>

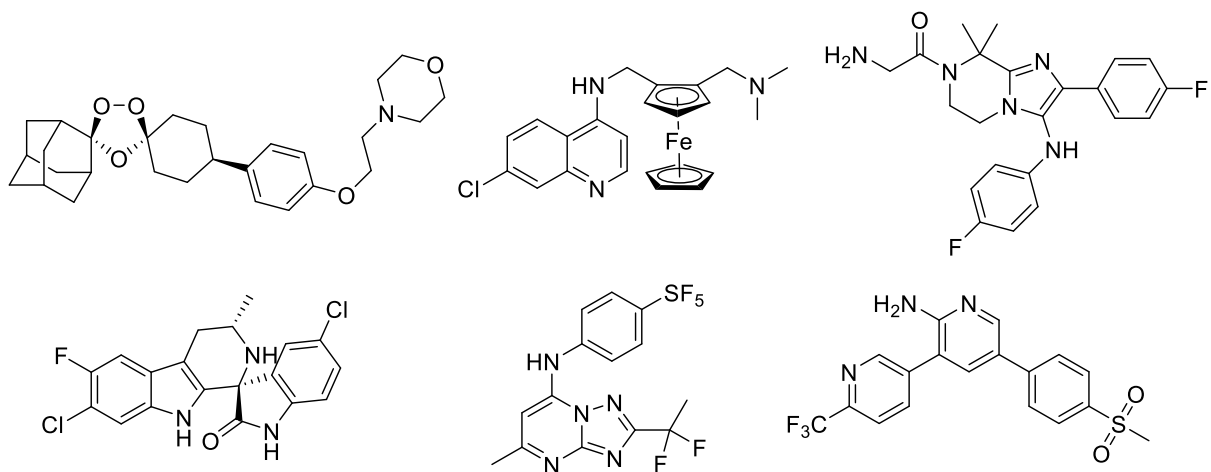


Figure 20 : Structures chimiques, de la gauche vers la droite, de l'artéfénoméle, de la ferroquine et du ganaplacide (en haut) et de la cipargamine, du composé DSM265 et du composé MMV048 (en bas).

La combinaison artéfénoméle/ferroquine regroupe une trioxolane et un dérivé de la chloroquine. Les trioxolanes (nom provenant du cycle à 5 côtés comportant 3 atomes d'oxygènes) sont des composés synthétiques visant à reproduire le pont endoperoxyde de l'artémisinine et provoquer ainsi la libération de radicaux dans le parasite.³⁷ L'atérolane, le premier trioxolane développé, est aujourd'hui uniquement utilisé en Inde (en combinaison avec la pipéraquline). La ferroquine est un compromis structural entre la chloroquine et le ferrocène.³⁸ Cette molécule, développée par des chercheurs lillois, a su monter une très bonne efficacité y compris chez des *Plasmodium* résistants aux différents dérivés de la quinine. L'indication envisagée de cette association est le traitement de l'accès simple palustre avec potentiellement l'utilisation d'une dose unique de traitement. Le développement est assuré par Sanofi et est actuellement en phase IIb (détermination de la dose thérapeutique).

Les 4 molécules suivantes ont fait récemment l'objet d'une revue par Ashton *et al.*³⁹ qui revient en détail sur leur parcours : de la découverte, en passant par l'optimisation chimique et les tests précliniques jusqu'aux essais cliniques en cours. Les activités biologiques de ces différentes molécules sont montrées dans l'Annexe 13.

Le ganaplacide est une imidazolo-piperazine développée par le laboratoire Novartis. Révélée en 2012⁴⁰, son mécanisme d'action n'a pas encore été déterminé. Cependant, on a remarqué une baisse de la sensibilité à cette molécule en présence de certaines mutations sur

³⁷ Charman SA, Arbe-Barnes S, Bathurst IC, Brun R, Campbell M, Charman WN, et al. Synthetic ozonide drug candidate OZ439 offers new hope for a single-dose cure of uncomplicated malaria. *P Natl Acad Sci USA*. 2011;108(11):4400-5.

³⁸ Biot C, Glorian G, Maciejewski LA, Brocard JS, Domarle O, Blampain G, et al. Synthesis and Antimalarial Activity in Vitro and in Vivo of a New Ferrocene-Chloroquine Analogue. *J Med Chem*. 1997;40(23):3715-8.

³⁹ Ashton TD, Devine SM, Möhrle JJ, Laleu B, Burrows JN, Charman SA, et al. The Development Process for Discovery and Clinical Advancement of Modern Antimalarials. *J Med Chem*. 2019;62(23):10526-62.

⁴⁰ Nagle A, Wu T, Kuhen K, Gagaring K, Borboa R, Francec C, et al. Imidazolo-piperazines: Lead Optimization of the Second-Generation Antimalarial Agents. *J Med Chem*. 2012;55(9):4244-73.

des protéines de transports⁴¹. La molécule est actuellement en phase IIb en association avec la luméfántrine pour le traitement de l'accès simple palustre.

La cipargamine est une spiroindolone révélée par Novartis en 2010.⁴² Son mécanisme d'action est inédit : elle inhibe la protéine ATP4. Il s'agit d'un transporteur primaire, régulant le taux de Na⁺ intraparasitaire, fonctionnant à l'aide d'ATP. L'inhibition entraîne une augmentation du Na⁺ intraparasitaire ce qui stoppe le développement du parasite et sa mobilité et provoque l'eryptose de l'hématie infectée conduisant à sa phagocytose (Annexe 14). Il reste cependant encore une zone d'ombre quant à savoir si cette protéine est la cible réelle ou si la molécule agit sur une autre protéine capable de réguler l'activité de PfATP4. Trois essais cliniques de phase IIa ont été complétés et un quatrième est en cours (mesure la tolérance et l'efficacité chez des sujets malades). Elle serait envisagée pour le traitement de l'accès palustre simple en monothérapie.

Le composé DSM265 est une triazolopyrimidine révélée en 2011.⁴³ Développée désormais par le laboratoire Takeda, elle possède aussi un mécanisme d'action inédit. C'est un inhibiteur de la dihydroorotate déhydrogénase (DHODH). Cette enzyme catalyse la synthèse d'orotate à partir de dihydroorotate. L'orotate est un précurseur pour la synthèse *de novo* des bases pyrimidines. Après avoir conclu un essai de phase II en monothérapie, une association avec l'artéfénomel a été testée au cours d'un essai de phase I. Ses propriétés pharmacocinétiques la rendent aussi intéressante pour la chimioprévention.

Le composé MMV048 est une bipyridine révélée en 2012.⁴⁴ Le projet est supporté par l'association « Medecines for Malaria Venture ». Là encore, il s'agit d'un mécanisme d'action innovant : c'est un inhibiteur de la phosphatidylinositol 4-kinase (PI4K). Cette enzyme phosphoryle les lipides et joue un rôle dans la pénétration des membranes par les mérozoïtes lors du stade hématocytaire. La molécule a commencé un essai de phase IIa en monothérapie.

⁴¹ Lim MY-X, LaMonte G, Lee MCS, Reimer C, Tan BH, Corey V, et al. UDP-galactose and acetyl-CoA transporters as Plasmodium multidrug resistance genes. Nat Microbiol. 2016];1(12).

⁴² Rottmann M, McNamara C, Yeung BKS, Lee MCS, Zou B, Russell B, et al. Spiroindolones, a Potent Compound Class for the Treatment of Malaria. Science. 2010;329(5996):1175-80.

⁴³ Coteron JM, Marco M, Esquivias J, Deng X, White KL, White J, et al. Structure-Guided Lead Optimization of Triazolopyrimidine-Ring Substituents Identifies Potent Plasmodium falciparum Dihydroorotate Dehydrogenase Inhibitors with Clinical Candidate Potential. J Med Chem. 2011;54(15):5540-61.

⁴⁴ Younis Y, Douelle F, Feng T-S, Cabrera DG, Manach CL, Nchinda AT, et al. 3,5-Diaryl-2-aminopyridines as a Novel Class of Orally Active Antimalarials Demonstrating Single Dose Cure in Mice and Clinical Candidate Potential. J Med Chem. 2012;55(7):3479-87.

4.6.2 Molécules en phase I des essais cliniques

Les essais cliniques de phase I permettent de vérifier l'innocuité chez l'Homme de la molécule testée.

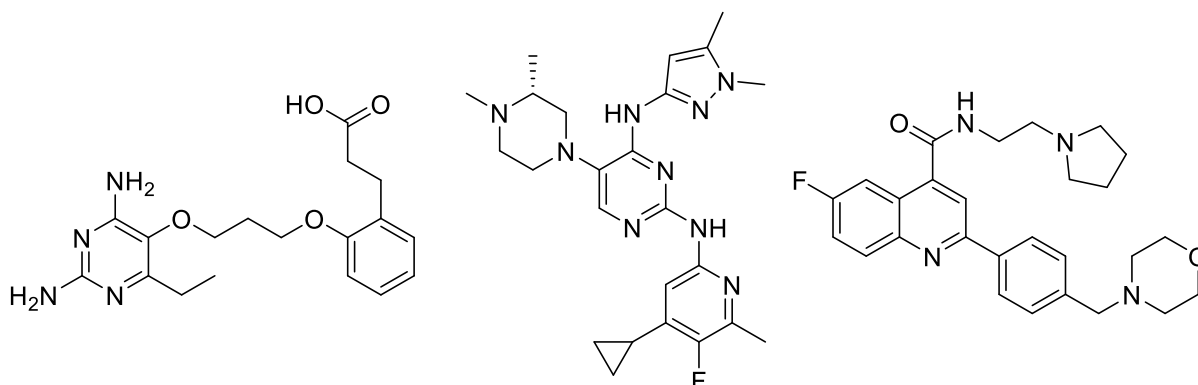


Figure 21 : Structures chimiques (de gauche à droite) des composés P218, MMV253 et M5717.

Le composé P218 est une molécule comportant un noyau pyrimidine. Révélée en 2012⁴⁵, son développement est assuré maintenant par le laboratoire Janssen. Ce noyau pyrimidine la rend structuralement proche du cycloguanil notamment et son mécanisme d'action est le même : inhibition de la dihydrofolate reductase. Son essai de phase I est terminé. Il est envisagé de l'employer à des fins de chimioprévention et donc actuellement, une forme injectable à action longue est en cours de développement.

Le composé MMV253 est un composé développé par le laboratoire AstraZeneca. Son mécanisme d'action est inconnu et il vient de démarrer un essai clinique de phase I.

Le composé M5717⁴⁶ est une 4-amidoquinoléine développée par le laboratoire Merck. Cette molécule possède une cible inédite : le *translation elongation factor 2* (eEF2). Ce facteur est responsable de la translocation des ribosomes sur les ARN messagers ; son inhibition provoque un arrêt de la synthèse protéique. L'essai de phase I est en cours.

4.6.3 Molécules en développement préclinique

Parmi les molécules au stade préclinique, on retrouve les composés MMV533, MMV183, MMV646 (Figure 22) et INE963. Seule la structure de MMV646 a pour l'instant été révélé. Les composés MMV533 et INE963 ont des mécanismes d'actions inconnus pour le moment. Le composé MMV183 inhibe l'acétylCoA synthase, protéine qui synthétise

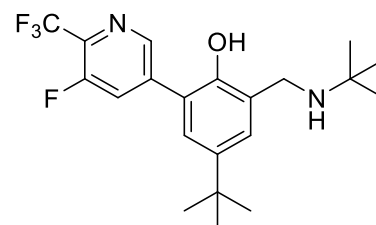


Figure 22 : Structure chimique du composé MMV646.

⁴⁵ Yuthavong Y, Tarnchompoo B, Vilaivan T, Chitnumsub P, Kamchonwongpaisan S, Charman SA, et al. Malarial dihydrofolate reductase as a paradigm for drug development against a resistance-compromised target. P Natl Acad Sci USA. 2012;109(42):16823-8.

⁴⁶ Baragaña, B., Hallyburton, I., Lee, M. C. S., Norcross, N. R., Grimaldi, R., Otto, T. D. et al. A novel multiple-stage antimalarial agent that inhibits protein synthesis. Nature. 2015;522(7556), 315–320.

l'acétyl-CoA, molécule importante pour de nombreuses voies métaboliques. Le composé MMV146 est capable d'inhiber la formation de l'hémozoïne (Schéma 1).

4.7 Nouvelles cibles prometteuses

La recherche, chez *Plasmodium*, de nouvelles cibles « drugables » c'est-à-dire de cibles moléculaires d'intérêt pouvant être inhibées/dérégulées constitue la base du développement de médicaments innovants. Voici quelques cibles d'intérêt.⁴⁷

Les plasmepsines constituent un groupe de 10 protéines plasmodiales. Les types I à IV ne sont pas intéressantes car non importantes pour la survie du parasite. Les types IX et X sont impliqués dans le mécanisme d'invasion cellulaire puisqu'une expérience utilisant un composé bloquant ces deux protéines a conduit à une inhibition de l'invasion mais aussi de la sortie du parasite que ce soit au stade hépatocytaire ou érythrocytaire.

Les Rab GTPases sont des protéines intervenant dans le transport des vésicules intraparasitaires vers la membrane parasitaire. Plus précisément Rab11a est essentielle dans la division du parasite au stade érythrocytaire. Cette protéine est aussi impliquée dans la voie de PI4K (ciblée par le composé MMV048, Figure 20).

Afin de s'extraire d'une hématie, le parasite doit traverser deux membranes : celle de la vacuole parasitaire (dans laquelle réside le parasite) et celle de l'hématie elle-même. Les chercheurs ont découvert deux protéines essentielles pour ces processus : SUB1 et SERA6. SUB1 participe au clivage de la membrane vacuolaire et un de ces substrats clivés est SERA6 qui elle participe à la rupture de la membrane érythrocytaire. L'inhibition de l'un ou l'autre empêcherait la multiplication du parasite dans le sang, par séquestration dans les hématies.

Les multiples voies métaboliques et les protéines au sein de celles-ci sont autant de cibles possibles restantes (Annexe 15). Enfin, la découverte de nouvelles cibles passe aussi par la découverte de molécules actives sur *Plasmodium* et dont la cible est découverte par la suite grâce à celles-ci. Par exemple, Cohen *et al.*⁴⁸ ont découvert une classe de molécules active sur *Plasmodium* aux stades hépatocytaire et érythrocytaire et possédant un mécanisme d'action différent de toutes les molécules commerciales.

⁴⁷ Mathews ES, Odom John AR. Tackling resistance: emerging antimalarials and new parasite targets in the era of elimination. *F1000Research*. 2018;7:1170.

⁴⁸ Cohen A, Suzanne P, Lancelot J-C, Verhaeghe P, Lesnard A, Basmaciyan L, et al. Discovery of new thienopyrimidinone derivatives displaying antimalarial properties toward both erythrocytic and hepatic stages of *Plasmodium*. *Eur J Med Chem*. 2015;95:16-28.

5 *Plasmodium*, un parasite résistant à tous les médicaments sur le marché

Depuis l'exploitation de la quinine comme médicament antipaludique à partir du milieu du XIX^{ème} siècle, *Plasmodium* (et principalement l'espèce majoritaire *P. falciparum*) a toujours réussi à s'adapter aux nouvelles thérapies développées au fur et à mesure des années (Tableau 3). Le parallèle est troublant avec la situation actuelle pour les antibiotiques. Aujourd'hui, dans certaines régions du monde, on peut mourir du neuropaludisme à cause d'une impasse thérapeutique comme on peut mourir d'une infection à *S. aureus* ou *P. aeruginosa* multi-résistante aux antibiotiques.

Tableau 3 : Date de mise sur le marché et de mise en évidence des premières résistances pour quelques molécules antipaludiques. D'après Paloque *et al.*⁴⁹

Molécule	Année de d'introduction	Première résistance rapportée
Quinine	1632	1910
Chloroquine	1945	1957
Proguanil	1948	1949
Mefloquine	1977	1982
Atovaquone	1996	1996

L'OMS a défini que le parasite est résistant quand il a « la capacité à survivre et / ou à se multiplier malgré l'administration et l'absorption d'un médicament administré à des doses égales ou supérieures à celles habituellement recommandées mais dans les limites de tolérance du sujet. Le médicament doit avoir accès au parasite ou au globule rouge infecté pendant la durée nécessaire à son action normale ».⁵⁰ Cliniquement, cela va se traduire par une clairance du parasite (taux auquel le parasite est éliminé de l'hôte) plus faible qu'en temps normal. Cette résistance peut aboutir à un échec thérapeutique du traitement cependant tout échec d'un traitement ne doit pas être interprété comme une résistance.

Une résistance peut être obtenue après une mutation sur un seul nucléotide de la séquence d'un gène. Si en contrepartie de la mutation, le parasite ne perd pas de capacité de développement ou de survie, alors la mutation sera sélectionnée parmi tous les parasites chez un hôte après un traitement. De nombreux facteurs vont ensuite faire que la résistance va

⁴⁹ Paloque L, Ramadani AP, Mercereau-Puijalon O, Augereau J-M, Benoit-Vical F. *Plasmodium falciparum*: multifaceted resistance to artemisinins. *Malar J.* 2016;15(1).

⁵⁰ Organisation Mondiale de la Santé. (Page consultée le 17/10/18). Drug resistance in malaria, [pdf en ligne]. <http://www.who.int/csr/resources/publications/drugresist/malaria.pdf>

pouvoir se propager ou non : le système immunitaire de l'hôte, la compliance du patient vis-à-vis de son traitement, une mauvaise prescription, les paramètres pharmacocinétiques du traitement, l'utilisation de médicaments contrefaits, etc...

Les principaux gènes impliqués dans les résistances aux médicaments seront détaillés (Annexe 16) afin de mettre en avant le caractère unique du mécanisme de la résistance à l'artémisinine et ses dérivés qui sera détaillée ensuite.

5.1 *Pf*CRT et chloroquino-résistance

La résistance à la chloroquine (4-aminoquinoléine dérivant de la quinine, Figure 7) est en grande majorité due à la mutation du gène *Pf*CRT (pour *P. falciparum* chloroquine resistance transporter). Mis en évidence en 1997 par Su *et al.*⁵¹, ce gène code pour une protéine à 10 domaines transmembranaires située dans la paroi de la vacuole digestive du parasite (là où est métabolisée l'hémoglobine).⁵² Normalement, la chloroquine va diffuser de manière passive au sein de la vacuole digestive. Or si le parasite possède le gène muté, la protéine transmembranaire qui en temps normal ignore la chloroquine, va désormais agir comme une pompe d'efflux vis-à-vis de celle-ci et diminuer la quantité de chloroquine au sein de la vacuole digestive.⁵³ La mutation de ce gène peut aussi provoquer une résistance à la quinine, l'amodiaquine ou encore la piperazine. La lumefantrine réagit de la manière inverse : elle est moins efficace chez les parasites possédant l'allèle sauvage.⁵⁴

La chloroquino-résistance est aujourd'hui répandue quasiment dans tous les pays où le paludisme est endémique (Annexe 17). Apparue en Asie du Sud-Est, elle a su profiter pour se répandre de la campagne d'éradication du paludisme de l'OMS par administration massive de chloroquine dans les années 60. Même si la campagne permit sur le moment d'éliminer le paludisme d'une vingtaine de pays, le manque de suivi entraîna cette transmission et 90% des cas de paludisme étaient résistants à la chloroquine en 1973. Cette résistance se retrouve chez *P. falciparum* quasiment partout et *P. vivax* en Asie du Sud-Est mais la résistance commence à apparaître chez *P. vivax* en Amérique du Sud (où il est l'espèce majoritaire).⁵⁵ C'est pour cela qu'aujourd'hui la chloroquine est le traitement de première ligne du paludisme n'étant pas dû à *P. falciparum*.

⁵¹ Su X, Kirkman LA, Fujioka H, Welles TE. Complex Polymorphisms in an 330 kDa Protein Are Linked to Chloroquine-Resistant *P. falciparum* in Southeast Asia and Africa. *Cell*. 1997;91(11):593-603.

⁵² Martin RE. The Malaria Parasite's Chloroquine Resistance Transporter is a Member of the Drug/Metabolite Transporter Superfamily. *Mol Biol Evol*. 2004;21(10):1938-49.

⁵³ Sanchez CP, McLean JE, Rohrbach P, Fidock DA, Stein WD, Lanzer M. Evidence for a *pfcr*t -Associated Chloroquine Efflux System in the Human Malarial Parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochemistry-US*. 2005;44(29):9862-70.

⁵⁴ Petersen I, Eastman R, Lanzer M. Drug-resistant malaria: Molecular mechanisms and implications for public health. *FEBS Letters*. 2011;585(11):1551-62.

⁵⁵ Gonçalves LA, Cravo P, Ferreira MU. Emerging *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine in South America: an overview. *Mem I Oswaldo Cruz*. 2014;109(5):534-9.

5.2 *PfMDR1* et résistance aux dérivés quinoléiques

Le gène *PfMDR1* (pour *multidrug resistant transporter*) code pour une protéine de la famille des ABCs (pour *ATP binding cassette*). Les ABCs sont des protéines transmembranaires servant de transporteurs. Elles métabolisent l'ATP en adénosine di-phosphate (ADP) afin d'effectuer un transport actif sur des molécules définies. Chez *Plasmodium*, cette protéine est située sur la paroi de la vacuole digestive. La version sauvage du gène est impliquée dans le transport de multiples molécules du cytosol parasitaire vers la vacuole digestive.⁵⁶ Cette version sauvage est notamment capable de transporter la quinine et la chloroquine tandis que la version mutante peut elle transporter l'halofantrine.⁵⁷ Au final, on se retrouve avec une protéine qui influence la résistance du parasite vis-à-vis de tous les aryl-aminoalcools, de la quinine et l'amodiaquine (Annexe 16, [54]).

Un gène de la même famille, *PfMRP* (pour *multidrug resistance-associated protein*), codant pour une protéine transmembranaire située cette fois dans la membrane parasitaire, semble interagir avec les médicaments.⁵⁸ Mais l'implication de cette protéine dans les mécanismes de résistances semble plutôt mineure et elle agirait de concert avec d'autres protéines membranaires.⁵⁹

5.3 Mutations dans la voie des folates et sur le cytochrome bc₁

Trois molécules antipaludiques agissent sur la voie des folates : la sulfadoxine, la pyriméthamine et le proguanil. Le parasite a su développer des mutations sur les deux enzymes ciblées par ses molécules : *PfDHPS* et *PfDHFR* (cf. 4.3 L'association sulfadoxine-pyriméthamine) et ainsi supprimer leurs effets.⁶⁰ La résistance à la combinaison sulfadoxine-pyriméthamine est apparue à la fin des années 1980 et se retrouve dans toutes les zones endémiques où peut être trouvé *P. falciparum* (Annexe 18).

Le cytochrome bc₁, qui fait partie de la chaîne respiratoire au sein de la mitochondrie, est lui ciblé par l'atovaquone. Des mutations de cette protéine sont liées à une résistance à l'atovaquone cependant, cette résistance est peu retrouvée à l'heure actuelle.⁶¹

⁵⁶ Duraisingh MT, Cowman AF. Contribution of the *pfmdr1* gene to antimalarial drug-resistance. *Acta Trop.* 2005;94(3):181-90.

⁵⁷ Sanchez CP, Rotmann A, Stein WD, Lanzer M. Polymorphisms within *PfMDR1* alter the substrate specificity for anti-malarial drugs in *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol.* 2008;70(4):786-98.

⁵⁸ Klokouzas A, Tiffert T, van Schalkwyk D, Wu C-P, van Veen HW, Barrand MA, et al. *Plasmodium falciparum* expresses a multidrug resistance-associated protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;321(1):197-201.

⁵⁹ Raj DK, Mu J, Jiang H, Kabat J, Singh S, Sullivan M, et al. Disruption of a *Plasmodium falciparum* Multidrug Resistance-associated Protein (*PfMRP*) Alters Its Fitness and Transport of Antimalarial Drugs and Glutathione. *J Biol Chem.* 2009;284(12):7687-96.

⁶⁰ Urdaneta L, Lal AA, Goldman I, Plowe C. Point mutations in dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase genes of *Plasmodium falciparum* isolates from Venezuela. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;61(3):457-62.

⁶¹ Korsinczyk M, Chen N, Kotecka B, Saul A, Rieckmann K, Cheng Q. Mutations in *Plasmodium falciparum* Cytochrome b That Are Associated with Atovaquone Resistance Are Located at a Putative Drug-Binding Site. *Antimicrob Agents Chem.* 2000;44(8):2100-8.

5.4 La résistance à l'artémisinine

Voyant que le parasite était devenu résistant aux différentes molécules, l'OMS voulait éviter que les dérivés d'artémisinine ne connaissent le même avenir. C'est pour cela qu'elle appela en 2006 à bannir toutes les monothérapies et d'utiliser uniquement les ACTs dans le traitement du paludisme.³¹ Malheureusement, l'OMS a vu juste et on voit apparaître dès 2009 dans la littérature des signes de résistance clinique à l'artémisinine en Asie du Sud-Est (dans la même région que pour l'apparition de la chloroquinorésistance et la

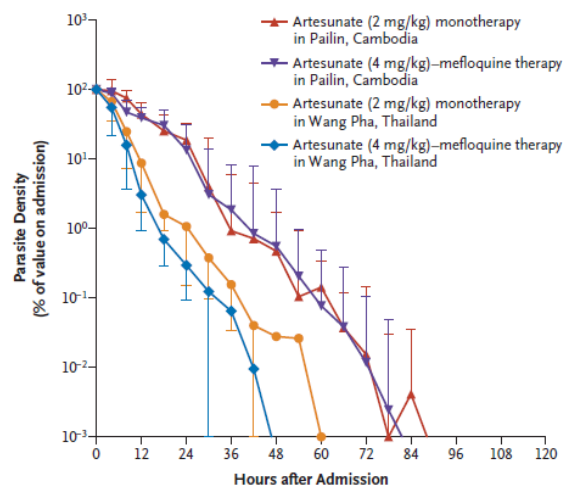


Figure 23 : Courbes représentant l'évolution de la parasitémie (en % par rapport à la parasitémie initiale) au cours des heures suivant le début du traitement. D'après Dondorp *et al.*⁶²

résistance à la combinaison sulfadoxine-pyriméthamine). Dondorp *et al.* sont les premiers à exposer des résultats allant dans ce sens.⁶² Ces chercheurs ont comparé l'efficacité d'une monothérapie d'artésunate et d'une ACT (artésunate-méfloquine) dans deux régions d'Asie du Sud-Est : Wang Tha en Thaïlande et Palin au Cambodge. Ils montrent que le temps de clairance parasitaire médian est de 48 heures à Wang Tha alors que celui-ci monte à 84 heures à Palin (Figure 23). Les IC₅₀ de différentes molécules sur les isolats des deux régions ne montraient pas de différence et les groupes possédaient des mutations des gènes *PfMDR1* et *PfRCT*. Ces résultats portent sur des données de 2006 mais aujourd'hui on soupçonne les premières apparitions de cette résistance au Cambodge dès 2001, c'est-à-dire avant le début de l'utilisation massive des ACTs.⁶³

5.4.1 Identification du mécanisme de la résistance

Le mécanisme par lequel s'effectue la résistance à l'artémisinine a été découvert en 2010 par l'équipe du Dr Françoise Benoit-Vical du Laboratoire de Chimie de Coordination de Toulouse.⁶⁴

A partir d'une souche sensible de *P. falciparum*, sur laquelle l'équipe a durant trois ans fait subir des cycles d'exposition *in vitro* à l'artémisinine, ils ont obtenu une souche résistante à l'artémisinine (baptisée F32-ART). Cette souche est capable de résister à une dose

⁶² Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyo AP, Tarning J, et al. Artemisinin resistance in Plasmodium falciparum malaria. *New Eng J Med.* 2009;361(5):455–467.

⁶³ Organisation Mondiale de la Santé. (Page consultée le 17/10/18). Artemisinin and artemisinin-based combination therapy resistance, [pdf en ligne]. <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255213/WHO-HTM-GMP-2017.9-eng.pdf?sequence=1>

⁶⁴ Witkowski B, Lelièvre J, Barragán MJL, Laurent V, Su X, Berry A, et al. Increased tolerance to artemisinin in Plasmodium falciparum is mediated by a quiescence mechanism. *Antimicrob Agents Ch.* 2010;54(5):1872–1877.

d'artémisinine 7000 fois supérieure aux autres parasites étudiés. Des tests furent effectués afin de déterminer la présence de mutations génétiques connues à l'époque (comme *PfMDR1*) pour être des marqueurs associés aux résistances mais celles-ci ne furent pas retrouvées. Cependant, l'expression de nombreux gènes est altérée entre les deux souches. Des observations directes sur la souche résistante après traitement ont révélé que seul le stade anneau (trophozoïte jeune dans l'hématie) était observable. Après suppression du traitement dans le milieu, ces parasites ont été capables de reprendre un cycle de développement normal. Ces observations directes du parasite ont donc permis de savoir que la résistance était médiée par un arrêt du développement du parasite au stade anneau, appelé quiescence ; quiescence qui est stoppée dès lors que le traitement disparaît.

Ce mécanisme de résistance est une première chez *Plasmodium*. Une quiescence similaire se retrouve chez *P. vivax* qui l'utilise lors de son stade hépatocytaire et est responsable des réviviscences du parasite jusqu'à plusieurs mois après l'arrêt de la maladie. Chez l'Homme, certaines cellules cancéreuses sont capables aussi de stopper leur cycle cellulaire sous l'effet du stress provoqué par les anticancéreux, devenir non-sensibles à ceux-ci, et de reprendre leur cycle après disparition du traitement.

D'autres équipes ont travaillé sur le phénomène, notamment celle de Tucker *et al.* qui suggère que cette quiescence n'était pas spécifique des souches résistantes mais plutôt que c'est la capacité du parasite à rentrer et à sortir de cette dormance plus ou moins vite et en plus ou moins grand nombre qui provoquait une résistance.⁶⁵ Ils arrivent à cette conclusion car les souches mères tolèrent dès le départ l'artémisinine (leurs souches et celle de l'équipe du LCC) et qu'elles sont originaires d'Afrique, où aucune résistance clinique n'a été retrouvée.

Par la suite, l'équipe du LCC a confirmé sur le terrain les observations menées sur la souche F32-ART. Des parasites, récupérés sur des patients, provenant des zones connues pour avoir des résistances cliniques sont capables de rentrer en dormance et d'échapper ainsi au traitement.⁶⁶ Cette étude pointe aussi le problème de détection de la résistance à l'artémisinine. La résistance aux autres antipaludiques est aisément mise en évidence

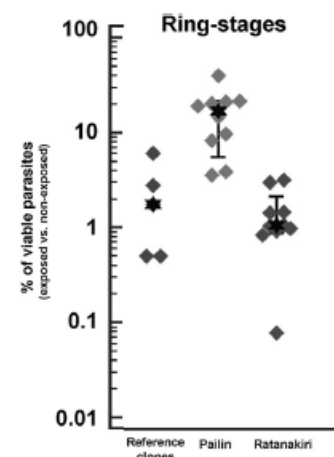


Figure 24 : Nuages de points représentant le % de parasites viables 66h après une exposition pendant 6h à 700 nM de DHA de différents isolats parasitaires. D'après Witkowski *et al.*⁶⁶

⁶⁵ Tucker MS, Mutka T, Sparks K, Patel J, Kyle DE. Phenotypic and Genotypic Analysis of In Vitro-Selected Artemisinin-Resistant Progeny of *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Ch.* 2012;56(1):302-14.

⁶⁶ Witkowski B, Khim N, Chim P, Kim S, Ke S, Kloeng N, et al. Reduced Artemisinin Susceptibility of *Plasmodium falciparum* Ring Stages in Western Cambodia. *Antimicrob Agents Ch.* 2013;57(2):914-23.

par des tests de chimiosensibilité classique (CI₅₀) basés sur une mesure de la prolifération parasitaire. Toute mutation portant sur des transporteurs ou sur les cibles biochimiques elles-mêmes va se traduire par une perte de sensibilité du parasite à la molécule testée. En revanche, la résistance aux artémisinines étant basée sur un arrêt du cycle du parasite, un tel test de chimiosensibilité n'est pas adapté (Annexe 19). Pour mettre en évidence cette résistance, un test plus complexe et ciblant les parasites au stade anneau (Figure 24), le RSA (pour *ring-stage survival assay*), a été mis au point. Par la suite un autre test a été développé, le QSA (pour *quiescent-stage survival assay*).

5.4.2 Principe du RSA et du QSA

Le RSA est un test biologique employé afin de déterminer si une souche est résistante à l'artémisinine et ses dérivés.⁶⁷ En partant de parasites en milieu sanguin, on va tout d'abord les synchroniser pour qu'ils soient tous au stade anneau. Ces parasites synchronisés sont ensuite exposés pendant 6 heures à l'artémisinine ou un dérivé ce qui va provoquer leur entrée en état de quiescence. La molécule est éliminée du milieu via un lavage puis les parasites sont mis à incuber. Après un temps d'incubation de 66 heures, la parasitémie peut être déterminée et comparée avec un témoin afin de déterminer si la souche testée est résistante ou non à l'artémisinine et ses dérivés.

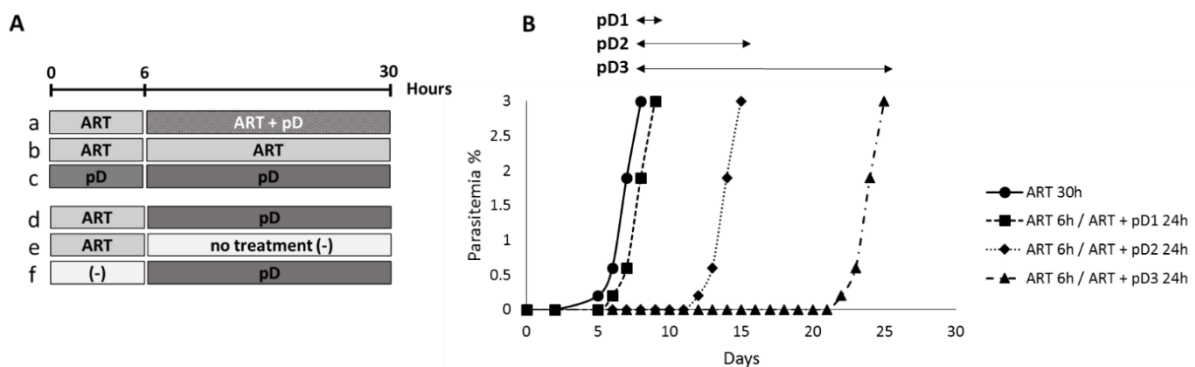


Figure 25 : Principe du test QSA. A : conditions employées durant le test. B : Exemples de résultats possibles avec 3 différentes molécules partenaires. Abréviations : ART = artémisinine ; pD = partner drug.

Le QSA est un test plus long qui dérive du RSA. Ce test permet de déterminer si une molécule est active sur les parasites qui sont maintenus en quiescence. Cette quiescence peut être maintenue en exposant le parasite à l'artémisinine pendant une durée plus importante que sur le RSA.

Après avoir suivi le début du protocole du RSA (synchronisation, exposition pendant 6 heures, lavage), une nouvelle condition est employée pendant 30 heures. Le milieu est lavé une

⁶⁷ Witkowski B, Amaratunga C, Khim N, Sreng S, Chim P, Kim S, et al. Novel phenotypic assays for the detection of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: in-vitro and ex-vivo drug-response studies. *Lancet Infect Dis.* 2013;13(12):1043-9.

dernière fois et les parasites sont ensuite comptés tous les jours afin de déterminer la parasitémie, jusqu'à ce qu'elle atteigne 3% soit la parasitémie initiale ou que la durée d'expérience dépasse 30 jours.

Dans l'exemple de la Figure 25, on a plusieurs conditions différentes. Les conditions qui nous intéressent le plus sont les conditions a et b (e et f sont des conditions témoins, d permet de voir l'effet de la molécule testée sur les parasites induits en quiescence et c l'effet de la molécule testée sur le parasite). La condition a, avec sa combinaison artémisinine/molécule test en seconde condition, permet de mesurer l'effet de la molécule test sur les parasites maintenus en quiescence par rapport à la condition b où il n'y a que l'artémisinine. On obtient les courbes montrées dans la Figure 25 : on cherche à obtenir un décalage du temps de retour à la parasitémie initiale. La molécule 1 ne possède pas d'effet sur les parasites quiescents, la molécule 2 un effet modéré et la molécule 3 est bien active.

5.4.3 Découverte du gène *Pfkelch13*, marqueur de la résistance à l'artémisinine

A partir de la souche résistante F32-ART, sélectionnée *in vitro*, de la souche témoin F32-TEM ainsi que des parasites provenant d'isolats de patients habitant des zones où est présente la résistance, l'équipe du Dr Benoit-Vical a procédé à un séquençage du génome de ces parasites afin de repérer les mutations communes.⁶⁸

Les résultats ont permis de mettre en évidence la mutation du gène PF3D7_1343700 codant pour la protéine *Pfkelch13* (appelée aussi mutation « K13-propeller ») parmi sept mutations apparaissant chez les parasites de la souche F32-ART par rapport à F32-TEM. La mutation apparaît au plus tôt aux alentours du 35^{ème} cycle de pression d'artémisinine effectuée sur F32-TEM, soit environ 6 mois après le début de cette expérience.⁶⁴

Les parasites provenant d'isolats de malades cambodgiens ont ensuite eu aussi leurs génomes analysés pour retrouver les mutations de la souche F32-ART. Celle-ci a permis de faire ressortir 4 allèles pour ce gène, allèles associés à une résistance observable via un RSA (Figure 26). Il montre aussi que certains allèles comme le C580Y sont présent en proportion non négligeable sur des isolats remontant à 2001. La fonction de ce gène et de la protéine en découlant n'est pas clairement établie. Ce gène

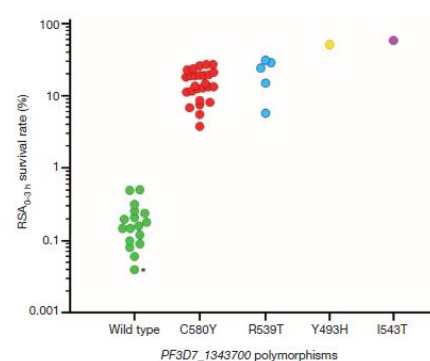


Figure 26 : Nuages de points mettant en relation le polymorphisme de *Pfkelch13* et le taux de survie suivant un test RSA. D'après Arley *et al.*⁶⁸

⁶⁸ 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*. 2013;505(7481):50-5.

code pour une protéine, de la superfamille des protéines kelch, de 726 acides aminés comportant trois domaines : un domaine spécifique à *Plasmodium*, un domaine BTB et le domaine kelch (Annexe 20). Toutes les mutations se situent sur ce dernier domaine. Par analogie avec des protéines de la même famille mais mieux connues chez d'autres espèces, on suppose qu'elles sont impliquées dans de nombreuses interactions protéines-protéines et régulent des mécanismes en lien avec le stress oxydatif et la dégradation des protéines via l'ubiquitine. On sait aussi, toujours via analogie avec des protéines de la même famille chez d'autres espèces et grâce à des données cristallographiques, que la protéine est un dimère (Annexe 21).⁶⁹

Afin de confirmer la responsabilité du gène *Pfkelch13* sur la résistance, ce gène fut muté artificiellement chez des souches de parasites non résistantes.⁷⁰ Les résultats montrent qu'en remettant un gène normal chez des souches résistantes du Cambodge on a une forte baisse de la survie du parasite et alors que l'inverse (gène mutant chez souches sauvages) provoque une hausse de la survie.

Des travaux de Mbengue *et al.* en 2015, exposent un lien entre *Pfkelch13* et *PfPI3K* (pour phosphoinositide 3-kinase ; Annexe 22).⁷¹ La version sauvage de la protéine K13 est capable de poly-ubiquitiner la protéine *PfPI3K* ce qui provoque sa dégradation. Une version mutante incapable de poly-ubiquitiner (ou alors peu) augmente alors la quantité de la protéine *PfPI3K* (confirmé par l'étude de l'expression de *PfPI3K* chez des isolats de patients cliniquement résistants) et donc une augmentation de son action : synthétiser le phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) qui alors régulerait de manière plus importante des voies métaboliques non identifiées. Ces chercheurs ont notamment obtenu des souches de parasites résistantes à l'artémisinine *in vitro* en augmentant artificiellement la quantité de PI3P dans le milieu, faisant de ce phospholipide un possible marqueur prédictif de la résistance à l'artémisinine. De même, une résistance a aussi pu être induite via l'augmentation artificielle de la protéine *PfAKT* (protéine kinase B). Ils ont aussi montré que *PfPI3K* est une des nombreuses cibles que comptent les dérivés d'artémisinine.

Mok *et al.* ont étudié le transcriptome d'un millier de parasites provenant de patients.⁷² Ils montrent que les parasites cliniquement résistants à l'artémisinine, en plus d'avoir un gène *Pfkelch13* muté, possède une hausse de l'expression de l'UPR (pour *unfolded protein*

⁶⁹ Protein Data Bank. (Page consultée le 19/10/18). Crystal Structure Analysis of Kelch protein (with disulfide bond) from *Plasmodium falciparum*, [en ligne]. <http://www.rcsb.org/structure/4ZGC>

⁷⁰ Straimer J, Gnadig NF, Witkowski B, Amaratunga C, Duru V, Ramadani AP, et al. K13-propeller mutations confer artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* clinical isolates. *Science*. 2015;347(6220):428-31.

⁷¹ Mbengue A, Bhattacharjee S, Pandharkar T, Liu H, Estiu G, Stahelin RV, et al. A molecular mechanism of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 2015;520(7549):683-7.

⁷² Mok S, Ashley EA, Ferreira PE, Zhu L, Lin Z, Yeo T, et al. Population transcriptomics of human malaria parasites reveals the mechanism of artemisinin resistance. *Science*. 2015;347(6220):431-5.

response). L'UPR est une réponse cellulaire au stress ayant pour origine un stress au niveau du réticulum endoplasmique. Lorsque des protéines dépliées ou mal repliées s'accumulent dans le réticulum endoplasmique, celui-ci active l'UPR qui va stopper la production de protéines, éliminer les protéines défectueuses puis augmenter la synthèse de protéines chaperonnes. Un stress prolongé qui va déborder ce mécanisme, entraîne l'activation de l'apoptose. L'activation de cette voie limiterait l'action de l'artémisinine, dont les radicaux interagiraient avec un grand nombre de protéines plasmodiales. Ces observations supportent les précédentes car *PfAKT* serait une protéine participant à la régulation de l'UPR.

Récemment, Bhattacharjee *et al.*⁷³ ont souhaité affiner encore plus le lien entre ces deux observations (Annexe 23). Ils ont découvert que les parasites porteurs de mutations sur le gène *Pfkelch13* avaient un nombre plus important de vésicules composées de PI3P. Ces vésicules seraient responsables de la séquestration des protéines endommagées par les radicaux provenant de l'artémisinine et aussi de l'augmentation de l'expression de la protéine *PfEMP1* (pour *erythrocyte membrane protein 1*) chez l'hématie infectée via une augmentation de son export vers celle-ci. Cette protéine est responsable de l'adhésion aux cellules endothéliales avec pour conséquences, évitement du système immunitaire et potentiellement favoriser un accès palustre grave.

Zhang *et al.*⁷⁴ ont étudié le rôle, plus en aval, de la protéine *PfPK4* (protéine kinase 4) et le facteur qu'elle phosphoryle, eIF2 α (pour *eukaryotic initiation factor-2 α*). Ils montrent que l'exposition à des dérivés d'artémisine augmentent la phosphorylation de eIF2 α et que ce mécanisme provoque une résistance à l'artémisinine. Ils montrent que l'inhibition de *PfPK4* permet de retrouver une sensibilité à l'artémisinine.

5.4.4 Mutation du gène *Pfkelch13* et résistance aux autres antipaludiques

Les travaux de Ménard *et al.* ont souligné la dangerosité de ces mutations. Cette étude consistait à comparer les paramètres d'autres molécules antipaludiques chez des parasites résistants.⁷⁵ En termes de CI₅₀, les résultats sont similaires entre souches normales et résistantes (F32-TEM et F32-ART). Mais l'étude expose ensuite chacune des souches à ces différents antipaludiques pendant 48h et le temps de retour à la parasitémie initiale a été monitoré. Pour certaines molécules (amodiaquine dont les résultats sont sur la Figure 27, méfloquine, pyriméthamine), on observe un retour à la parasitémie initiale plus rapide chez la souche

⁷³ Bhattacharjee S, Coppens I, Mbengue A, Suresh N, Ghorbal M, Slouka Z, et al. Remodeling of the malaria parasite and host human red cell by vesicle amplification that induces artemisinin resistance. *Blood*. 2018;131(11):1234-47.

⁷⁴ Zhang M, Gallego-Delgado J, Fernandez-Arias C, Waters NC, Rodriguez A, Tsuji M, et al. Inhibiting the Plasmodium eIF2 α Kinase PK4 Prevents Artemisinin-Induced Latency. *Cell Host Microbe*. 2017;22(6):766-776.e4.

⁷⁵ Ménard S, Ben Haddou T, Ramadani AP, Arieu F, Iriart X, Beghain J, et al. Induction of Multidrug Tolerance in Plasmodium falciparum by Extended Artemisinin Pressure. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(10):1733-41.

résistante que la normale. De plus aucun des gènes marqueurs de ces résistances (*PfMDR1*, *PfDHFR*) sont présents dans la souche F32-ART. Ces résultats sont inquiétants car outre la sélection des parasites résistants aux traitements à l'artémisinine, ces parasites pourront aussi devenir plus résistants aux molécules associées (tout en sachant qu'ils peuvent aussi porter d'autres gènes de résistances à d'autres antipaludiques) et ainsi réduire de plus en plus l'arsenal thérapeutique disponible.

5.4.5 Situation actuelle sur le terrain

Aujourd'hui, plusieurs mutations du gène *Pfkelch13* sont confirmées comme étant responsables de résistances à l'artémisinine : N458Y, Y493H, R539T, I543T et la plus importante, C580Y.

A l'heure actuelle, la résistance est toujours cantonnée à l'Asie du Sud-Est (Cambodge, Laos, Myanmar, Vietnam et Thaïlande). Elle se cumule aux autres résistances et de ce fait, au Cambodge, jusqu'à 5 ACTs ont un taux d'échec dépassant les 10% (Annexe 24). Des cas de décès suite à des accès palustres graves à cause de l'échec de traitements IV d'artésunate sont rapportés dans la littérature.⁷⁶ Toujours au Cambodge, dans certaines zones, notamment au niveau de la frontière thaïlandaise, l'allèle sauvage de *Pfkelch13* a quasiment disparu (Figure 28).⁷⁷

En Afrique, malgré un cas de résistance retrouvée chez un patient revenant de Guinée Equatoriale, rien ne laisse penser que pour le moment la résistance soit en Afrique.⁷⁸ Cependant, certaines mutations du gène *Pfkelch13* ont été retrouvée en Afrique mais ne sont pas celles conférant une résistance (Figure 28). Le danger est que, si la résistance se propage en Afrique,

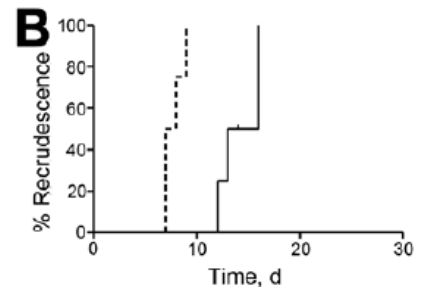


Figure 27 : Evolution du retour à la parasitémie initiale en fonction du temps après traitement à l'amodiaquine chez une souche non-résistante à l'artémisinine (trait plein) et chez une souche résistante (pointillés). D'après Ménard *et al.*⁷⁵

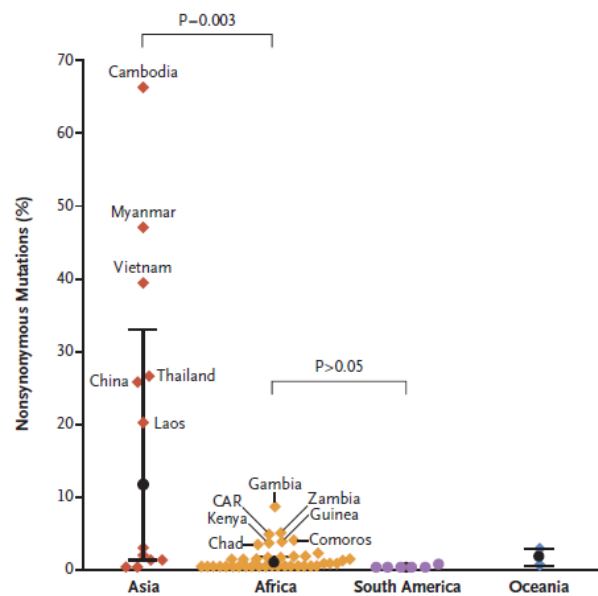


Figure 28 : Proportions de souches parasitaires possédant une mutation non-synonyme du gène *Pfkelch13*, par pays et régions du monde. D'après Ménard *et al.*⁷⁷

⁷⁶ Phyo AP, Win KK, Thu AM, Swe LL, Htike H, Beau C, et al. Poor response to artesunate treatment in two patients with severe malaria on the Thai–Myanmar border. *Malar J.* déc 2018;17(1).

⁷⁷ Ménard D, Khim N, Beghain J, Adegnik AA, Shafiul-Alam M, Amodu O, et al. A Worldwide Map of *Plasmodium falciparum* K13-Propeller Polymorphisms. *New Eng J Med.* 2016;374(25):2453-64.

⁷⁸ Lu F, Culleton R, Zhang M, Ramaprasad A, von Seidlein L, Zhou H, et al. Emergence of Indigenous Artemisinin-Resistant *Plasmodium falciparum* in Africa. *New Eng J Med.* 2017;376(10):991-3.

on voit le taux mortalité repartir à la hausse dans les années à venir. En effet à l'heure actuelle, les populations sont de moins en moins exposées au paludisme et donc ne développent pas d'immunité vis-à-vis de celui-ci. La propagation serait alors comparable en termes de danger à celle qui a accompagné la résistance à la chloroquine.

En attendant que la recherche trouve une parade à cette résistance, l'OMS réagit en travaillant sur le développement de thérapies combinées triple à base d'artémisinine (TACT en anglais). Une première étude combinant artéminol-pipéraquline-méfloquine est prévue.⁷⁹

⁷⁹ Worldwide Antimalarial Resistance Network. (Page consultée le 19/10/18). Tracking resistance to artemisinin collaboration II, [en ligne]. <http://www.wwarn.org/working-together/partner-projects/tracking-resistance-artemisinin-collaboration-ii>

6 Molécules et cibles d'intérêt contre les parasites quiescents

Pour pouvoir éliminer cette résistance chez un patient, il faut être en mesure d'éliminer les parasites qui ont pu se mettre en quiescence à l'aide d'une nouvelle molécule antipaludique. Puisque cette hypothétique molécule serait en association avec un dérivé d'artémisinine, car ces combinaisons restent les traitements les plus efficaces encore aujourd'hui, le meilleur moyen *in vitro* à l'heure actuelle pour tester l'efficacité d'une molécule sur une souche de parasites résistants à l'artémisinine est d'effectuer un test QSA.

Deux choix de cibles sont à notre disposition pour éliminer ces parasites quiescents :

- Cibler les voies protéiques en lien avec la protéine mutante *Pfkelch13*
- Cibler les voies métaboliques encore actives chez les parasites quiescents.

6.1 Molécules ciblant les voies protéiques en lien avec *Pfkelch13*

Les voies entourant la protéine *Pfkelch13* sont loin d'être toutes connues et la protéine elle-même ne l'est pas complètement, cependant quelques pistes commencent à émerger.

6.1.1 Inhibiteurs de PI3K

PfPI3K et son métabolite PI3P ont été prouvés comme étant des médiateurs de la résistance à l'artémisinine et que l'inhibition de la protéine, surexprimée chez les mutants *Pfkelch13* entraîne un retour de la sensibilité à l'artémisinine.⁷¹ Malgré cela, pour le moment seulement deux molécules ressortent

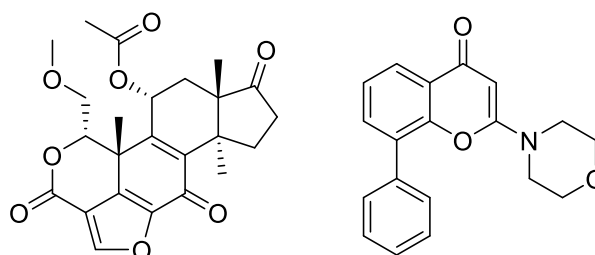


Figure 29 : Structures chimiques de la wortmannine (à gauche) et du composé LY294002 (à droite).

de la littérature pour l'inhibition de *PfPI3K* : la wortmannine et le composé LY294002 (Figure 29). *In vitro*, sur *PfPI3K*, elles possèdent respectivement une IC_{50} de 1,8 et 25 μ M.

6.1.2 Inhibiteurs de P4K

Les travaux précédemment décrits de Zhang *et al.* montrent l'intérêt de cibler la protéine P4K pour lutter contre la résistance.⁷⁴ Durant leurs expériences, ils ont utilisé le composé GSK2606414 (Figure 30). Initialement décrit par Axten *et al.*⁸⁰ comme étant un inhibiteur de la protéine PERK (pour *Protein Kinase R (PKR)-like Endoplasmic Reticulum Kinase*), elle est utilisée par Zhang chez *Plasmodium* car *Pf*PK4 et PERK possèdent des similarités établies. Au final, les tests de recrudescence effectués par Zhang, bien qu'il ne s'agisse pas de QSA, montrent l'intérêt de cibler *Pf*PK4 pour rendre les parasites quiescents de nouveau sensibles aux dérivés d'artémisinine.

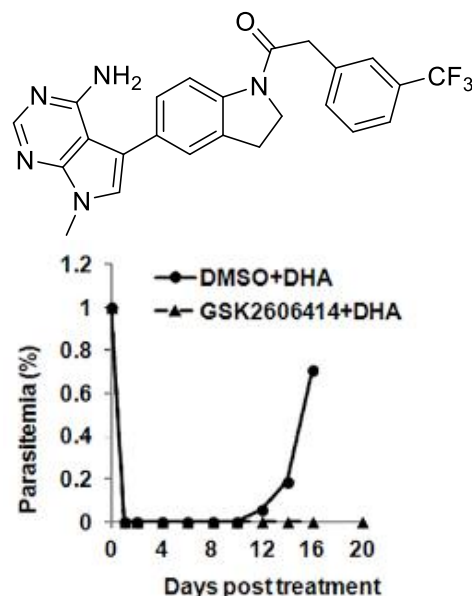


Figure 30 : En haut, structure chimique du composé GSK2606414. En bas, influence de GSK2606414 sur le temps de retour à la parasitémie initiale ; d'après Axten *et al.*⁸⁰

6.2 Molécules ciblant les voies actives chez les parasites quiescents

Il est prouvé que certaines voies métaboliques sont inactives chez les parasites quiescents comme par exemple la glycolyse, la synthèse d'acide désoxyribonucléique (ADN) ou de protéines.⁸¹ Mais divers travaux montrent que toutes les voies ne sont pas éteintes chez les parasites quiescents.

6.2.1 Inhibiteurs de PI4K

La phosphatidylinositol 4-kinase (PI4K) est une enzyme synthétisant du phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P) à partir de phosphatidylinositol. Le PI4P est impliqué dans la signalisation intracellulaire. Le composé MMV048 cible notamment cette protéine (cf. 4.6.1 Molécules en phase 2 des essais cliniques). McNamara *et al.* ont eux découvert d'autres types de composés ciblant cette protéine : KDU691, une imidazopyrazine et BQR695, une quinoxaline (Figure 31).⁸² Ces composés sont actifs sur tous les stades de *Plasmodium*.

⁸⁰ Axten JM, Medina JR, Feng Y, Shu A, Romeril SP, Grant SW, et al. Discovery of 7-Methyl-5-(1-{[3-(trifluoromethyl)phenyl]acetyl}-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-amine (GSK2606414), a Potent and Selective First-in-Class Inhibitor of Protein Kinase R (PKR)-like Endoplasmic Reticulum Kinase (PERK). *J Med Chem.* 2012;55(16):7193-207.

⁸¹ Chen N, LaCrue AN, Teuscher F, Waters NC, Gatton ML, Kyle DE, et al. Fatty Acid Synthesis and Pyruvate Metabolism Pathways Remain Active in Dihydroartemisinin-Induced Dormant Ring Stages of *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Ch.* 2014;58(8):4773-81.

⁸² McNamara CW, Lee MCS, Lim CS, Lim SH, Roland J, Nagle A, et al. Targeting *Plasmodium* PI(4)K to eliminate malaria. *Nature.* 2013;504(7479):248-53.

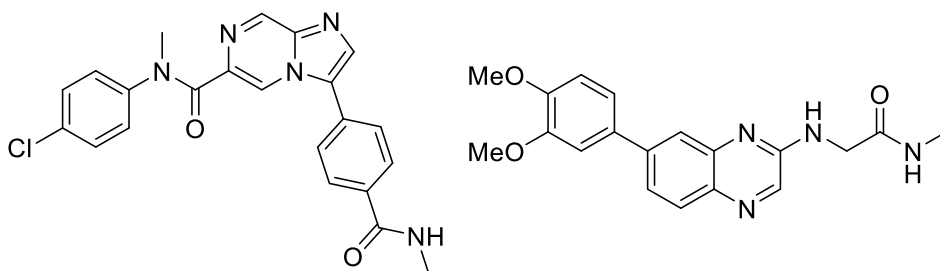


Figure 31 : Structures chimiques des composés KDU691 (à gauche) et BQR695 (à droite).

Dembélé *et al.* ont utilisé le composé KDU691 (Figure 32) chez des parasites induits en quiescence (après un traitement à l'artémisinine).⁸³ Le composé est plus actif chez ces parasites que chez des parasites dans un stade anneau normal et il entraîne l'inhibition de la croissance chez des parasites mis en quiescence (Figure 33). Ces expériences constituent des pistes intéressantes permettant d'envisager l'utilisation du composé KDU691 dans un test QSA standard.

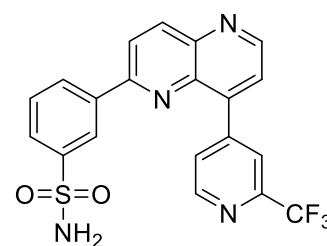


Figure 32 : Structure chimique du composé KDU691.

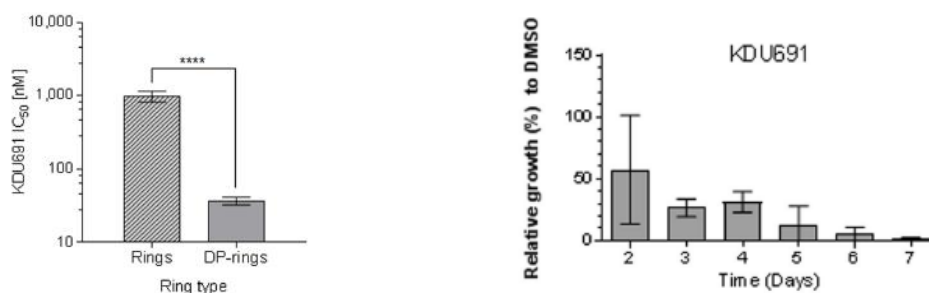


Figure 33 : A gauche, IC₅₀ du composé KDU691 chez des parasites au stade anneau et chez des parasites induits en quiescence par un pré-traitement à l'artémisinine (DP-rings). A droite, croissance relative de parasites pré-traités à l'artémisinine puis exposés 24h au composé KDU691 par rapport à un témoin DMSO. D'après Dembéle *et al.*⁸³

Très récemment, Kandepedu *et al.* ont découvert une nouvelle famille de composé actifs sur PfP4K, les naphthyridines et le hit présenté dans leurs travaux possède une IC₅₀ de l'ordre de la centaine de nM.⁸⁴

6.2.2 La voie des isoprénoïdes

Les isoprénoïdes sont des composés organiques synthétisés par les organismes vivants et constituent les précurseurs de nombreuses familles de molécules (les stéroïdes par exemple).

⁸³ Dembele L, Ang X, Chavchich M, Bonamy GMC, Selva JJ, Lim MY-X, et al. The Plasmodium PI(4)K inhibitor KDU691 selectively inhibits dihydroartemisinin-pretreated Plasmodium falciparum ring-stage parasites. *Sci Rep-UK*. 2017;7(1).

⁸⁴ Kandepedu N, González Cabrera D, Eedubilli S, Taylor D, Brunschwig C, Gibhard L, et al. Identification, Characterization, and Optimization of 2,8-Disubstituted-1,5-naphthyridines as Novel Plasmodium falciparum Phosphatidylinositol-4-kinase Inhibitors with in Vivo Efficacy in a Humanized Mouse Model of Malaria. *J Med Chem*. 2018;61(13):5692-703.

En 2017, Duvalsaint et Kyle étudient l'influence de phytohormones, utilisées chez les plantes dans la voie des isoprénoïdes, chez *P. falciparum* y compris chez des parasites quiescents.⁸⁵ Ils montrent que l'acide gibérellique permet une sortie de quiescence accélérée chez les parasites quiescents. Le temps de retour à la parasitémie initiale est lui augmenté quand les parasites sont traités avec de la fluridone, un pesticide inhibiteur agissant sur la voie des isoprénoïdes (Figure 34).

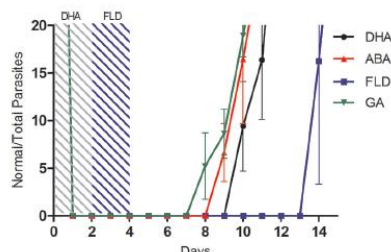
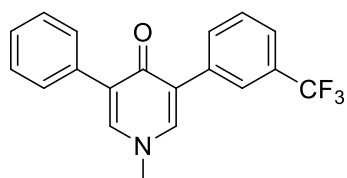


Figure 34 : A gauche, structure chimique de la fluridone. A droite, évolution du retour à la parasitémie initiale pour différentes conditions : noir, DHA seule pendant 2 jours ; rouge, DHA 2 jours puis acide abscissique ; vert, DHA 2 jours puis acide gibérellique et bleu DHA 2 jours puis fluridone 2 jours. D'après Duvalsaint et Kyle.⁸⁵

Wang *et al.* ont eux développés des dérivés de la fosmidomycine, un antibiotique ciblant la voie des isoprénoïdes.⁸⁶ Leur hit possède une CI_{50} de 13nM sur *P. falciparum* mais aucun test sur souche résistante à l'artémisinine n'a été fait.

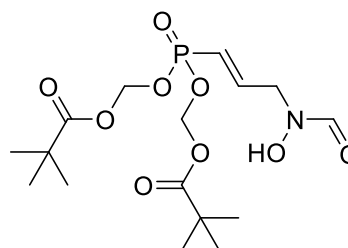


Figure 35 : Structure chimique du hit de Wang *et al.*⁸⁶

6.2.3 La voie des acides gras (FASII)

En 2014, Chen *et al.* se sont intéressés au métabolisme chez les parasites quiescents.⁸¹ Pour cela, les auteurs mesurent le niveau d'expression des nombreux gènes codant pour des protéines impliquées dans diverses voies métaboliques (glycolyse, cycle de Krebs, chaîne respiratoire, voie des acides gras, voie des folates etc...) chez des parasites mis en état de quiescence par exposition à de l'artémisinine. Les résultats montrent que plusieurs enzymes au sein de la voie des acides gras (Annexe 25) sont encore actives chez les parasites quiescents. Les niveaux d'expression mesurés sont stables entre les parasites normaux et quiescents voire même augmentés.

⁸⁵ Duvalsaint M, Kyle DE. Phytohormones, Isoprenoids, and Role of the Apicoplast in Recovery from Dihydroartemisinin-Induced Dormancy of *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Ch.* 2018;62(3).

⁸⁶ Wang X, Edwards RL, Ball H, Johnson C, Haymond A, Girma M, et al. MEPicides: α,β -Unsaturated Fosmidomycin Analogues as DXR Inhibitors against Malaria. *J Med Chem.* 2018;61(19):8847-58.

Des inhibiteurs de la voie des acides gras furent ensuite testés afin d'évaluer leur effet sur ces parasites quiescents dont le triclosan. Le triclosan est une molécule connue depuis longtemps : c'est un pesticide qui était très utilisé dans les années 70 et qui a des propriétés biocides (antifongiques et antibactériennes). C'est un inhibiteur de FabI chez *Plasmodium*, une enzyme retrouvée dans la voie des acides gras.¹⁴ L'utilisation de cette molécule, après l'exposition des parasites à de l'artémisinine, augmente le temps de récupération du taux de la parasitémie.

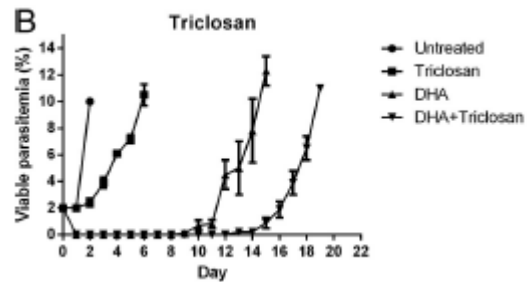
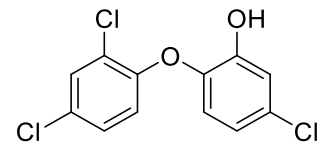


Figure 36 : en haut, structure chimique du triclosan ; en bas, test QSA avec le triclosan, d'après Chen *et al.*⁸¹

Bien que cette voie soit peu envisagée dans le développement de molécules antipaludiques, on dispose de plusieurs molécules la ciblant en plus du triclosan et de ses dérivés proches.⁸⁷

6.2.4 Les voies mitochondriales

Dans l'étude détaillée précédemment, les auteurs ont mis en évidence que l'expression de certains gènes de ces voies métaboliques était maintenue chez les parasites quiescents.⁸⁷ Ils ont découvert que le niveau d'expression du cytochrome b était maintenu. Cette protéine fait partie du complexe III de la chaîne respiratoire.

Peatey *et al.* se sont intéressés plus précisément à ces voies mais cette fois par le biais du potentiel de membrane mitochondrial, reflet de l'activité de la chaîne respiratoire.⁸⁸ Cette activité peut être révélée via un marqueur fluorescent, la rhodamine 123. Cette étude a permis de montrer que les parasites positifs à la fluorescence après un traitement à l'artémisinine et entrés dans un état de quiescence étaient ceux qui finissaient par redonner une parasitémie normale. De plus ces parasites ont un niveau d'expression des protéines de la voie des acides gras similaire à ceux

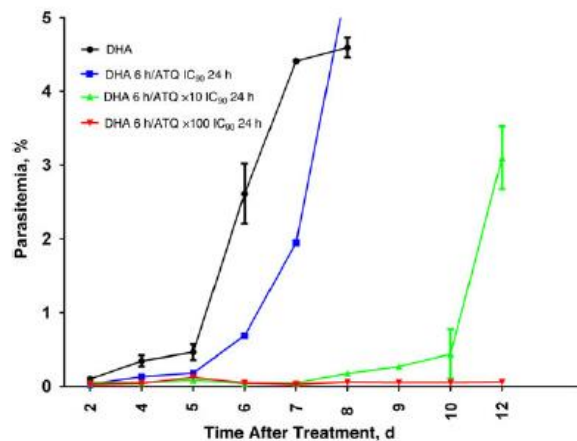


Figure 37 : Temps de retour à la parasitémie initiale pour différentes conditions (DHA = Dihydroartémisinine ; ATQ = atovaquone). D'après Peatey *et al.*⁸⁸

⁸⁷ Qidwai T, Khan F. Antimalarial Drugs and Drug Targets Specific to Fatty Acid Metabolic Pathway of Plasmodium falciparum: Drug targets of P. falciparum FAS II pathway. Chem Biol Drug Des. 2012;80(2):155-72.

⁸⁸ Peatey CL, Chavchich M, Chen N, Gresty KJ, Gray K-A, Gatton ML, et al. Mitochondrial Membrane Potential in a Small Subset of Artemisinin-Induced Dormant Plasmodium falciparum Parasites In Vitro. J Infect Dis. 2015;212(3):426-34.

de l'étude précédente. Donc la présence d'un potentiel de membrane mitochondrial et donc d'une activité de la chaîne respiratoire est un marqueur de la quiescence des parasites. Enfin, les auteurs ont regardé l'influence de l'utilisation de l'atovaquone (Figure 12) sur la récupération de la parasitémie (Figure 37). L'atovaquone est à l'heure actuelle la seule molécule antipaludique sur le marché qui cible la chaîne respiratoire des parasites (site Q_O de l'enzyme bc_1). Son utilisation à la suite de l'exposition à l'artémisinine permet d'augmenter le temps de retour à une parasitémie normale.

Contrairement à la voie précédente, les voies mitochondriales sont plus explorées dans la recherche de nouveaux antipaludiques.

Yeates *et al.* ont décrit des 4-pyridones substituées en position 5 par diverses chaînes aromatiques (Figure 38).⁸⁹ Parmi ces composés, on retrouve le composé GW844520. Contrairement à ce que les auteurs pensaient, ce composé agirait sur le site Q_I de l'enzyme bc_1 ⁹⁰ (et non Q_O comme l'atovaquone) expliquant qu'il possède une CI_{50} de 1 nM sur une souche de *P. falciparum* résistante à l'atovaquone. Un dérivé, le composé GSK932121 avec le soutien de GSK, est allé jusqu'à la phase I des essais cliniques. Son développement a été stoppé à cause de sa toxicité.⁹¹ Récemment, ils ont publié une nouvelle série de molécules basée sur le même noyau et qui présente des paramètres pharmacocinétiques améliorés.⁹²

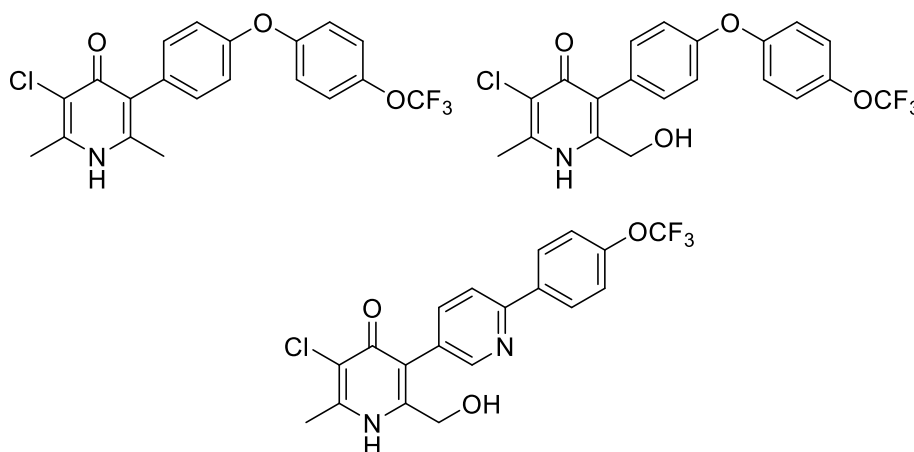


Figure 38 : Structures chimiques des composés GW844520 et GSK932121 (en haut) et du nouveau hit de Bueno *et al.*⁹² (en bas).

Une autre classe de molécules décrites pour agir sur les voies mitochondriales sont les ELQ (pour *endochin-like quinolones*, Figure 39). L'endochine est une molécule antipaludique

⁸⁹ Yeates CL, Batchelor JF, Capon EC, Cheesman NJ, Fry M, Hudson AT, et al. Synthesis and Structure–Activity Relationships of 4-Pyridones as Potential Antimalarials. *J Med Chem.* 2008;51(9):2845-52.

⁹⁰ Capper MJ, O'Neill PM, Fisher N, Strange RW, Moss D, Ward SA, et al. Antimalarial 4(1H)-pyridones bind to the Q_I site of cytochrome bc_1 . *P Natl Acad Sci USA.* 2015;112(3):755-60.

⁹¹ Clinicaltrials.gov. (Page consultée le 24/10/18) A First Time in Human Study in Healthy Volunteers to Investigate a New Medicine to Treat Malaria, [en ligne]. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00811356?id=NCT00811356&rank=1>

⁹² Bueno JM, Calderon F, Chicharro J, De la Rosa JC, Díaz B, Fernández J, et al. Synthesis and Structure–Activity Relationships of the Novel Antimalarials 5-Pyridinyl-4(1 H)-Pyridones. *J Med Chem.* 2018;61(8):3422-35.

développée dans les années 1940 qui était très active chez des modèles précliniques mais pas chez l'Homme. On découvra plus tard que cette molécule est hautement métabolisée chez l'Homme. Nilsen *et al.*⁹³ en se basant sur la structure de l'endochine et de composés comme l'atovaquone ou les pyridones décrites précédemment, a obtenu l'ELQ-300, une molécule comportant un noyau quinolone et une chaîne latérale similaire à GW844520 avec une IC₅₀ de 2nM. Ils ont par la suite développé l'ELQ-400 où la substitution du noyau quinolone a été retravaillée pour aboutir à une molécule active *in vivo* sur tous les stades de *Plasmodium*.⁹⁴ Cependant contrairement aux précédentes molécules, Song *et al.* ont démontré via co-cristallisation que l'ELQ-400 cible à la fois les sites Q_O et Q_I de l'enzyme bc₁.⁹⁵

Enfin, Neelarapu *et al.* ont travaillé sur le même noyau quinolone mais ont substitué par une chaîne sur la position 7 et non 3 comme pour les ELQ (Figure 39).⁹⁶ Ils ont obtenu de bons résultats *in vivo* sur le stade érythrocytaire avec des quinolones substituées par une chaîne N-phénylpipérazinyle.

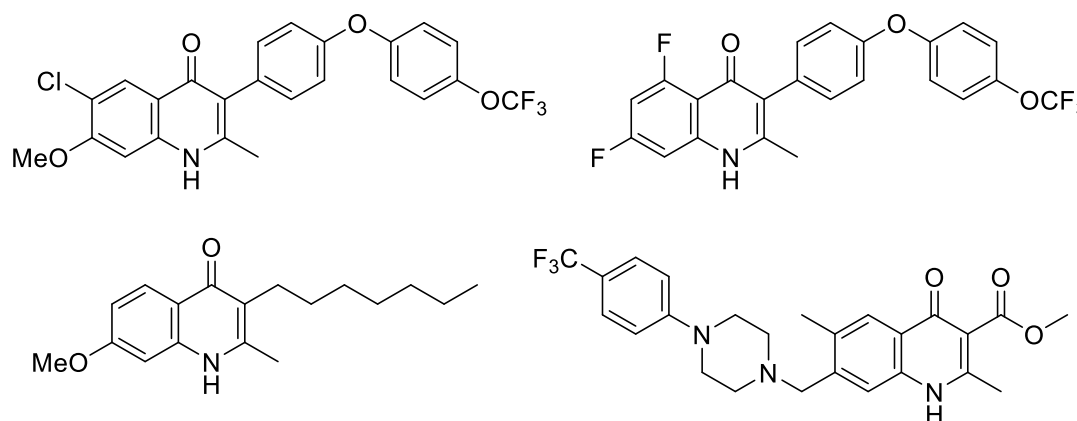


Figure 39 : En haut, structures chimiques de l'ELQ-300 (à gauche) et ELQ-400 (à droite) ; en bas, structures chimiques de l'endochine (à gauche) et du hit de Neelarapu *et al.*⁹⁶

Outre le cytochrome bc₁, une autre cible des voies mitochondriales est la cible de nouveaux composés. La dihydroorotate déshydrogénase, ciblée par le composé DSM265 par exemple, est présente aussi au niveau de la mitochondrie où elle intervient dans la production d'ubiquinol utilisée ensuite par le complexe bc₁ (Annexe 26).

⁹³ Nilsen A, Miley GP, Forquer IP, Mather MW, Katneni K, Li Y, et al. Discovery, Synthesis, and Optimization of Antimalarial 4(1 H)-Quinolone-3-Diarylethers. *J Med Chem.* 2014;57(9):3818-34.

⁹⁴ Nilsen A, Forquer IP, Riscoe MK, Stickles AM, Morrisey JM, Miley GP, et al. Inhibition of Cytochrome bc₁ as a Strategy for Single-Dose, Multi-Stage Antimalarial Therapy. *Am J Trop Med Hyg.* 2015;92(6):1195-201.

⁹⁵ Song Z, Iorga BI, Mounkoro P, Fisher N, Meunier B. The antimalarial compound ELQ-400 is an unusual inhibitor of the bc₁ complex, targeting both Q_O and Q_I sites. *FEBS Lett.* 2018;592(8):1346-56.

⁹⁶ Neelarapu R, Maignan JR, Lichorowic CL, Monastyrskiy A, Mutka TS, LaCrue AN, et al. Design and Synthesis of Orally Bioavailable Piperazine Substituted 4(1 H)-Quinolones with Potent Antimalarial Activity: Structure–Activity and Structure–Property Relationship Studies. *J Med Chem.* 2018;61(4):1450-73.

6.2.5 Les voies épigénétiques

Sur la base d'expériences effectuées par l'équipe V du LCC, une dernière voie pour éliminer les parasites quiescents existe. Des tests QSA ont été effectués avec des inhibiteurs d'histones déacétylases (HDACs) comme le vorinostat ou la trichostatine A et ces molécules se sont révélées efficaces contre les parasites maintenus en quiescence.

Les HDACs sont des protéines catalysant la perte d'un groupement acétyl sur les lysines des histones. Les histones sont les protéines autour desquelles l'ADN s'enroule et se compacte. Plus ces groupements sont présents sur les histones et plus l'ADN sera décompacté de l'histone. Ce phénomène favorise alors le travail des polymérase. Leur action s'oppose à celle des histones acétyltransferases (HAT). Cette régulation de l'expression génétique, et d'autres, sont étudiées par l'épigénétique qui « étudie des changements dans l'activité des gènes, n'impliquant pas de modification de la séquence d'ADN et pouvant être transmis lors des divisions cellulaires ». ⁹⁷ 4 inhibiteurs HDACs sont cliniquement utilisés en hématologie : la romidepsine, le belinostat, le vorinostat et le panobinostat (Figure 40). Ces 4 molécules sont actives chez *Plasmodium* (la romidepsine est cependant peu sélective du parasite). ⁹⁸ Les trois dernières molécules possèdent une fonction commune, la fonction acide hydroxamique. Cette fonction est porteuse de l'activité : elle va venir interagir avec le zinc du site catalytique de l'HDAC. ⁹⁹

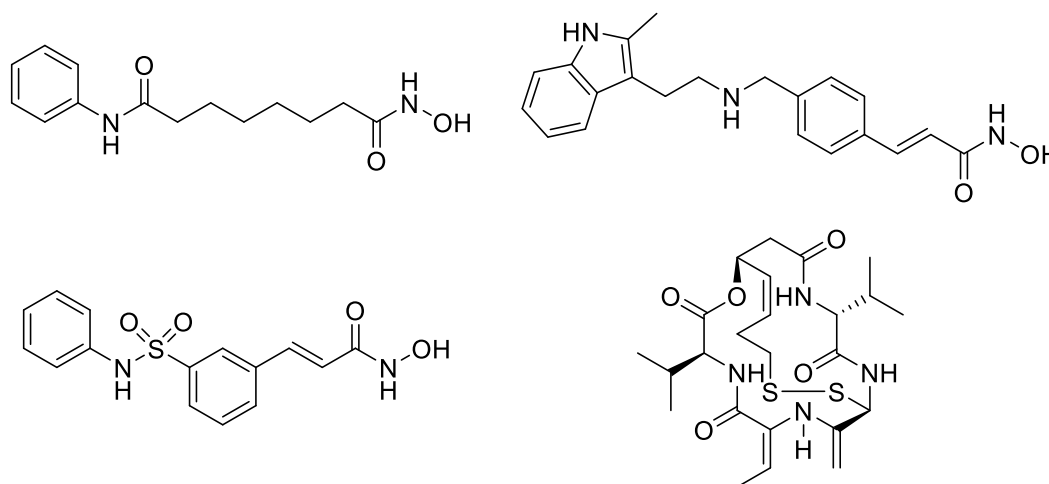


Figure 40 : En haut, structures chimiques du vorinostat (à gauche) et du panobinostat (à droite) ; en bas, structures chimiques du belinostat (à gauche) et de la romidepsine (à droite).

⁹⁷ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale. (Page consultée le 25/10/18). Epigénétique : un génome, plein de possibilités !, [en ligne]. <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/epigenetique>

⁹⁸ Chua MJ, Arnold MSJ, Xu W, Lancelot J, Lamotte S, Späth GF, et al. Effect of clinically approved HDAC inhibitors on Plasmodium, Leishmania and Schistosoma parasite growth. *Int J Parasitol-Drug*. 2017;7(1):42-50.

⁹⁹ Richon VM. Cancer biology: mechanism of antitumour action of vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid), a novel histone deacetylase inhibitor. *Brit J Cancer*. 2006;95(S1):S2-6.

Ontoria *et al.* ont décrit une nouvelle série d'inhibiteurs d'HDACs (Figure 41) inhibant la croissance de *Plasmodium* avec des doses submicromolaires (CE₅₀).¹⁰⁰ La principale différence est la disparition de la fonction acide hydroxamique au profit d'une fonction amide.

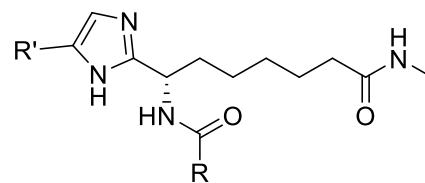


Figure 41 : Structure générale des composés d'Ontoria *et al.*¹⁰⁰

Les inhibiteurs de HDACs sont les plus étudiés (que ce soit chez l'Homme ou *Plasmodium*) mais d'autres enzymes pourraient être ciblées. Les lysines déméthylases (KDMs) sont des protéines supprimant des groupements méthyles sur les lysines des histones provoquant un effet similaire aux HDACs. De nombreuses molécules les ciblant sont dans la littérature mais reste à les tester chez *Plasmodium* (Annexe 27 ou encore les travaux de Westaway *et al.*¹⁰¹). Une dernière enzyme pouvant être ciblée est la lysine déacétylase (KDAC) dont l'activité est identique aux HDACs mais sur des lysines. Wang *et al.* ont testé plusieurs inhibiteurs de KDACs chez *P. falciparum* et tous possèdent des CI₅₀ autour du nM.¹⁰²

¹⁰⁰ Ontoria JM, Paonessa G, Ponzi S, Ferrigno F, Nizi E, Biancofiore I, et al. Discovery of a Selective Series of Inhibitors of Plasmodium falciparum HDACs. ACS Med Chem Lett. 2016;7(5):454-9.

¹⁰¹ Westaway SM, Preston AGS, Barker MD, Brown F, Brown JA, Campbell M, et al. Cell Penetrant Inhibitors of the KDM4 and KDM5 Families of Histone Lysine Demethylases. 1. 3-Amino-4-pyridine Carboxylate Derivatives. J Med Chem. 2016;59(4):1357-69.

¹⁰² Wang Q, Rosa BA, Nare B, Powell K, Valente S, Rotili D, et al. Targeting Lysine Deacetylases (KDACs) in Parasites. PLOS Neglect Trop Dis. 2015;9(9):e0004026.

7 L'approche hybride

Cibler les voies essentielles, encore fonctionnelles chez les parasites quiescents, à l'aide de molécules actives afin de pouvoir éliminer les parasites apparaît donc pertinent mais cette diversité de cibles et de localisations nécessite une approche particulière afin de pouvoir développer des molécules efficaces : la conception de molécules hybrides, capables de cibler plusieurs cibles en même temps.

Une molécule peut être qualifiée d'hybride lorsqu'elle comporte au moins deux noyaux actifs différents et est donc capable d'agir sur au moins deux cibles biologiques différentes. On catégorise les hybrides principalement selon la nature de l'hybridation :

- Hybrides conjugués : les noyaux sont reliés par un linker
- Hybrides conjugués clivables : une ou plusieurs liaisons entre le linker et les noyaux peuvent être clivées, permettant la libération de ces derniers.
- Hybrides fusionnés : les noyaux sont collés l'un à l'autre.
- Hybrides chimériques : l'hybride final comporte un motif commun aux noyaux le composant.

En plus de ce critère de catégorisation, on peut aussi utiliser la nature des noyaux (sous forme de prodrogue ou non) ou selon leurs interactions avec les cibles (Annexe 28).

Le développement de molécules hybrides est retrouvé dans des domaines tels que la cancérologie, le traitement du SIDA, l'inflammation ou plus récemment la maladie d'Alzheimer.^{103,104} Cette stratégie a aussi été bien explorée pour lutter contre le paludisme.

7.1 Hybrides antipaludiques développés

Un des premiers composés hybrides antipaludiques à avoir été développé est la ferroquine. Compromis structural entre la chlorquine et le ferrocène (Schéma 2), le succès de la molécule sur le plan clinique (aujourd'hui une des thérapies innovantes les plus avancées dans les essais cliniques) a incité la recherche à développer des molécules hybrides, basées en général sur des médicaments déjà sur le marché.

¹⁰³ Kucuksayan, E ; Ozben, T. Hybrid Compounds as Multitarget Directed Anticancer Agents. *Curr Top Med Chem.* 2017, 17, 907.

¹⁰⁴ Rochais C, Lecoutey C, Gaven F, Giannoni P, Hamidouche K, Hedou D, et al. Novel Multitarget-Directed Ligands (MTDLs) with Acetylcholinesterase (AChE) Inhibitory and Serotonergic Subtype 4 Receptor (5-HT 4 R) Agonist Activities As Potential Agents against Alzheimer's Disease: The Design of Donecopride. *J Med Chem.* 2015;58(7):3172-87.

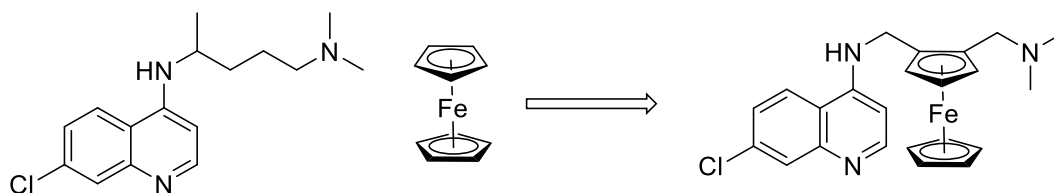


Schéma 2 : Molécules à l'origine de la ferroquine (à droite) : la chloroquine et le ferrocène.

7.1.1 Basés sur l'artémisinine

Chez ces molécules, on va retrouver l'utilisation d'un cycle 1,2,4-trioxane (tel qu'on le retrouve chez l'artémisinine et ses dérivés), porteur de l'activité de l'artémisinine. On peut citer comme exemple les trioxaquinés, molécules où la chaîne latérale de la chloroquine est modifiée dans le but de porter ce cycle trioxane. Une trioxaquine, PA1103 (Figure 42), était un bon candidat médicament mais son développement a depuis été stoppé.¹⁰⁵ L'hybridation a aussi été poussée jusqu'à inclure ce trioxane sur la ferroquine donnant des trioxaferroquines.¹⁰⁶

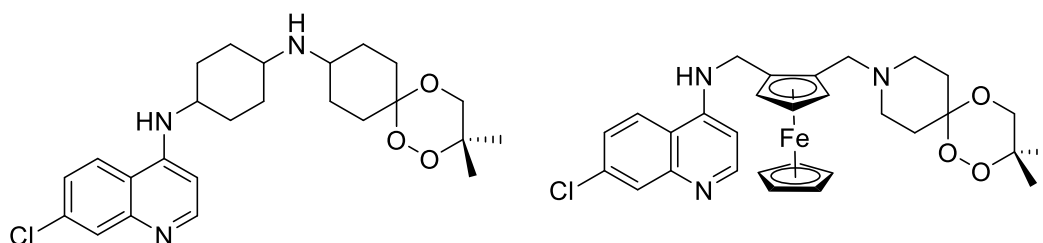


Figure 42 : Structures chimiques de la trioxaquine PA1103 (à gauche) et d'une trioxaferroquine (à droite).

D'autres hybrides à bases d'artémisinine ont été réalisés en se servant cette fois du carbonyle libre, sur laquelle on vient former des éthers ou esters dans les dérivés d'artémisinines. Feng *et al.* ont par exemple substitué des artémisinines par des noyaux quinoléines sur cette position.¹⁰⁷

7.1.2 Basés sur les dérivés quinoléiques

Les différents médicaments dérivant de la quinine se prêtent bien à la réalisation d'hybrides grâce à leur chaîne latérale (en position 4 ou 8 du noyau quinoléine).

Chez les 4-aminoquinoléines, les travaux se sont concentrés sur la chloroquine (Figure 43). Singh *et al.* ont réalisé des hybrides où la chaîne latérale de la chloroquine est substituée par différentes aminopyrimidines similaires à la pyriméthamine afin d'obtenir une action sur *PfDHFR* en plus de l'action de la chloroquine.¹⁰⁸ Un travail similaire a été réalisé par Manohar

¹⁰⁵ Cosledan F, Fraisse L, Pellet A, Guillou F, Mordmuller B, Kreamsner PG, et al. Selection of a trioxaquine as an antimalarial drug candidate. *P Natl Acad Sci USA*. 2008;105(45):17579-84.

¹⁰⁶ Bellot F, Cosledan F, Vendier L, Brocard J, Meunier B, Robert A. Trioxaferroquines as new hybrid antimalarial drugs. *J Med Chem*. 2010;53(10):4103-09.

¹⁰⁷ Feng T-S, Guantai EM, Nell MJ, van Rensburg CEJ, Hoppe HC, Chibale K. Antiplasmodial and antitumor activity of dihydroartemisinin analogs derived via the aza-Michael addition reaction. *Bioorg Med Chem Lett*. 2011;21(10):2882-6.

¹⁰⁸ Singh K, Kaur H, Chibale K, Balzarini J. Synthesis of 4-aminoquinoline-pyrimidine hybrids as potent antimalarials and their mode of action studies. *Eur J Med Chem*. 2013;66:314-23.

et al. qui via « chimie click » ont introduit des triazines sur la chaîne latérale de la chloroquine afin notamment d'obtenir un effet similaire à celui du cycloguanil mais aussi faciliter la diffusion de la partie quinoléine vers la vacuole digestive du parasite grâce aux propriétés basiques des triazines.¹⁰⁹

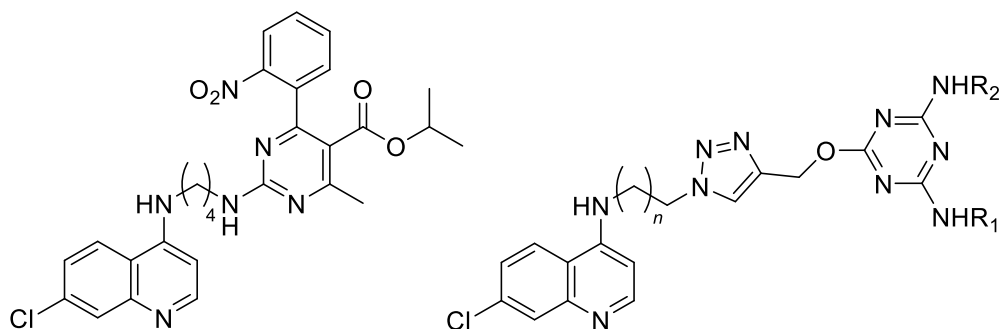


Figure 43 : Structures chimiques illustrant les travaux de Singh *et al.*¹⁰⁸ (à gauche) et Manohar *et al.*¹⁰⁹ (à droite).

Chez les 8-aminoquinoléines, la base principale pour les travaux est la primaquine. Matos *et al.* sont partis de celle-ci et y ont greffé un ferrocène pour former ce qu'ils qualifient de primacènes (Figure 44).¹¹⁰ Le but était d'obtenir un effet similaire à l'ajout de ce ferrocène chez la ferroquine (meilleure activité que la chloroquine et activité contre les souches résistantes). Un des composés a pu montrer une activité sur le stade hépatocytaire de *Plasmodium* 45 fois meilleure que la primaquine.

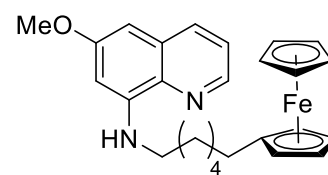


Figure 44 : Structure chimique d'un primacène.

7.1.3 Hybrides comportant un chimiosensibilisant

Une dernière approche retrouvée pour les hybrides antipaludiques est la formation d'hybrides comportant une partie antipaludique (basée sur ceux existants)

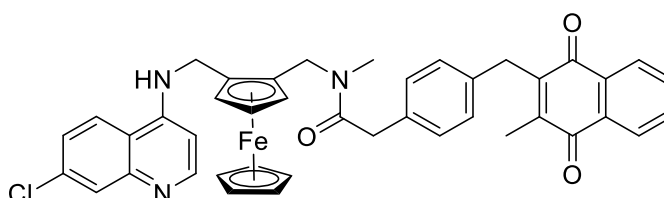


Figure 45 : Exemple de molécule réalisée par Chavain *et al.*¹¹¹ et une partie chimiosensibilisante, qui va potentialiser l'effet de la première. Chavain *et al.* ont introduit des naphthoquinones sur la ferroquine via un lien amide clivable *in vivo* (Figure 45).¹¹¹ Les naphthoquinones sont des molécules qui vont diminuer le taux intracellulaire de glutathion, molécule détoxifiante diminuant l'effet des dérivés quinoléiques sur la détoxification de l'hème. Cependant l'activité de ces composés n'est pas plus élevée que la ferroquine.

¹⁰⁹ Manohar S, Khan SI, Rawat DS. Synthesis of 4-aminoquinoline-1,2,3-triazole and 4-aminoquinoline-1,2,3-triazole-1,3,5-triazine Hybrids as Potential Antimalarial Agents. *Chem Biol Drug Des.* 2011;78(1):124-36.

¹¹⁰ Matos J, da Cruz FP, Cabrita É, Gut J, Nogueira F, do Rosário VE, et al. Novel Potent Metallocenes against Liver Stage Malaria. *Antimicrob Agents Ch.* 2012;56(3):1564-70.

¹¹¹ Chavain N, Davioud-Charvet E, Trivelli X, Mbeki L, Rottmann M, Brun R, et al. Antimalarial activities of ferroquine conjugates with either glutathione reductase inhibitors or glutathione depletors via a hydrolyzable amide linker. *Bioorg Med Chem.* 2009;17(23):8048-59.

7.2 Hybrides ciblant les parasites résistants à l'artémisinine

L'approche retenue pour la réalisation d'hybrides contre les parasites quiescents est le développement d'hybrides conjugués clivables, conçus de la façon suivante : deux noyaux, actifs sur les voies précédemment citées, seront reliés à un linker via des fonctions clivables (esters, carbonates, carbamates etc...) permettant la libération, par hydrolyse enzymatique, des noyaux intacts (sans modification de leurs structures) et du linker biologiquement inactif. Au regard des exemples décrits précédemment, cette approche conceptuelle est une première chez les antipaludiques. Elle mérite d'être explorée compte-tenu de ses nombreux avantages :

- Un risque réduit d'apparition de résistances vis-à-vis des noyaux.
- Une amélioration de la solubilité d'un noyau à l'aide de l'autre ou bien du linker permettant ainsi une meilleure biodisponibilité.
- Un possible effet synergique entre les deux noyaux (comme par exemple chez les trioxaquinés ou bien l'association atovaquone-proguanil).
- Une diminution possible de la toxicité d'un noyau via la libération de celui-ci au plus près de sa cible
- Des avantages sur le médicament final lui-même par rapport à une bithérapie : formulation et pharmacocinétique simplifiée, coûts de développement et démarches administratives réduits, meilleure observance du patient car moins de traitements à prendre.

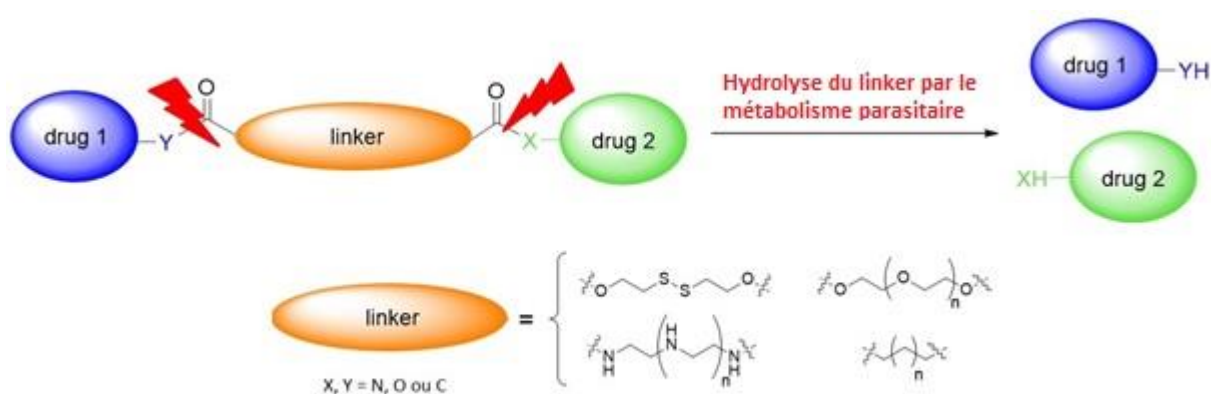


Figure 46 : Concept d'hybrides visant à cibler les parasites résistants à l'artémisinine.

8 Travaux de stage de Master 2

Les travaux suivants ont été réalisés, au Laboratoire de Chimie de Coordination de Toulouse, au sein de l'équipe V « Nouvelles molécules antipaludiques et approches pharmacologiques » dirigée par le Dr François-Vical et encadrés par le Dr Deraeve.

8.1 Objectifs du stage

Plusieurs paramètres sont importants à prendre en compte dans la conception des molécules hybrides (Annexe 28), et en particulier :

- La nature des noyaux, qui doivent être actifs sur *P. falciparum* mais surtout sur les parasites quiescents. Ces noyaux doivent de plus présenter une fonction chimique compatible avec le greffage sur le linker.
- La nature de la fonction clivable (ester, carbonate, carbamate, ...)
- Le type de linker (alkyl, polyéthylène glycol, polyamine, ...) et sa longueur

Le premier objectif de ce stage a donc consisté à synthétiser des molécules issues de la littérature (présentés précédemment), ayant une bonne activité antipaludique et ciblant les voies métaboliques impliquées dans la quiescence, afin de mesurer leur activité sur les parasites quiescents lors d'un test QSA. En effet, peu de molécules sont actuellement décrites comme étant actives sur les parasites mis en quiescence : le triclosan, l'atovaquone ou encore le vorinostat ; il est donc important d'en identifier de nouvelles.

Le second objectif de ce stage a été la synthèse des hybrides présentant certaines des molécules précédemment discutées et ensuite effectuer leur caractérisation. Concernant le linker et le choix de la fonction clivable, des travaux préliminaires au sein du laboratoire avaient été réalisés sur un linker comportant un pont disulfure et des fonctions carbonates aux extrémités. Toutefois les réactions réalisées, décrites par Jain *et al.*¹¹² se sont montrées expérimentalement être parasitées par des phénomènes de trans-thioétherification en solution, rendant les purifications difficiles et les rendements médiocres (Schéma 3).

¹¹² Jain AK, Gund MG, Desai DC, Borhade N, Senthilkumar SP, Dhiman M, et al. Mutual prodrugs containing bio-cleavable and drug releasable disulfide linkers. *Bioorganic Chemistry*. 2013;49:40-8.

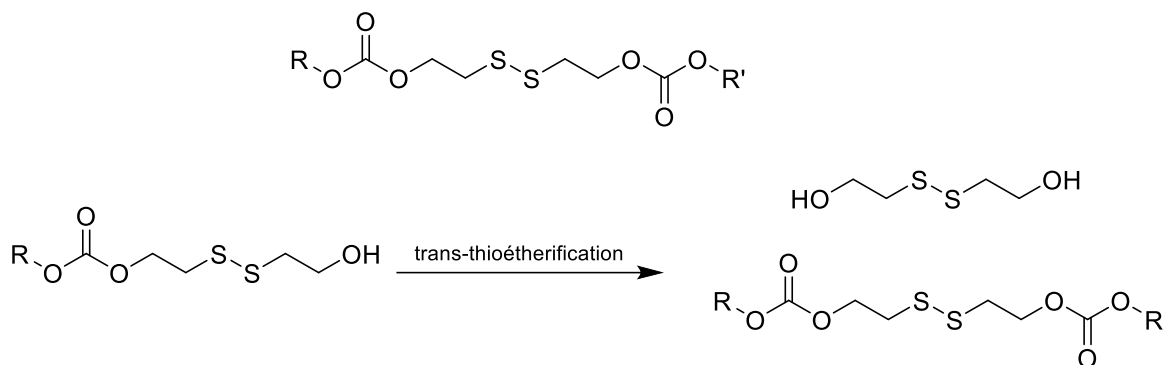


Schéma 3 : En haut, structure chimique du linker disulfure-carbonate ; en bas, impuretés résultant du phénomène de trans-thioétherification.

Le pont disulfure a donc été remplacé par un lien éther stable, tout en conservant les fonctions carbonates pour la liaison aux noyaux actifs. D'autre part, afin d'étudier l'influence de ce lien clivable, un second linker présentant des fonctions esters a également été sélectionné, entraînant par conséquent une modification de la chaîne du linker (alkyle et non polyoxygénée, Figure 47).

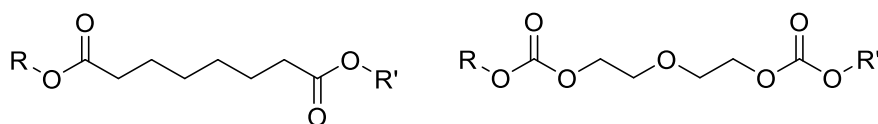


Figure 47 : A gauche, linker de type alkyl-ester ; à droite, linker de type diéthylène glycol-carbonate.

8.2 Discussion

8.2.1 Synthèse de molécules actives d'intérêt

8.2.1.1 Composé GW844520

Le composé GW844520 cible le site Q_I de l'enzyme bc₁ de la chaîne respiratoire et possède une CI₅₀ de 1 nM chez *P. falciparum*^{89,90}. Ce composé a été synthétisé à partir de deux synthons (Schéma 4) : d'une part le cycle pyridone (synthon a) et d'autre part le biaryléther (synthon b). L'accès au composé souhaité est obtenu via un couplage de Suzuki-Miyaura.

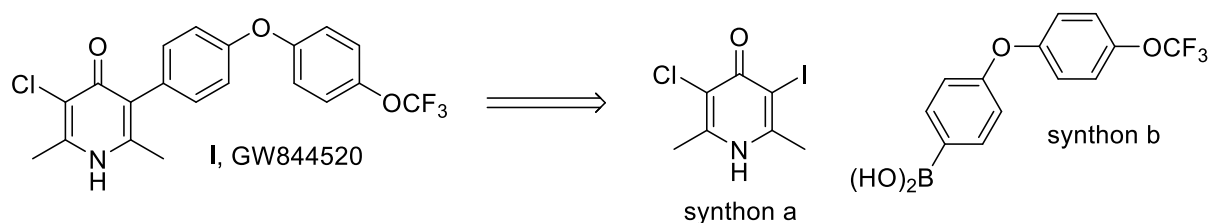


Schéma 4 : Schéma rétrosynthétique de GW844520

8.2.1.1.1 Synthèse du synthon a

La synthèse (Schéma 5) a démarré par la transformation d'un cycle pyranone en un cycle pyridone. Initialement décrite avec un mélange ammoniac aqueux/éthanol à 140°C pendant 8

heures¹¹³, les conditions employées pour cette réaction (absence de cosolvant organique, température et temps de réaction réduits) permettent d'obtenir la pyridone **1** avec un rendement proche de 90% (par rapport aux 50% décrits). Il faut tout de même retenir la différence en termes de quantité de matière première entre les deux qui limite la comparaison entre les deux conditions.

Les deux positions libres sur le cycle pyridone **1** ont ensuite été fonctionnalisées l'une après l'autre. Une monochloration par le N-chlorosuccinimide a tout d'abord été réalisée en position 3 du noyau pyridone. Un sous-produit de dichloration (positions 3 et 5, appelé clopidol, Figure 48) est également observé. Cette impureté étant proche, en terme de Rf (Rapport frontal), du composé **2** et étant de plus inerte vis-à-vis des réactions suivantes, elle n'a pas été éliminée et la suite de la synthèse a été conduite sur le mélange. L'iodation sur la dernière position libre (position 5) a été réalisée à l'aide de diiode, après déprotonation de la position libre à l'aide d'hydroxyde de sodium. Le synthon a (molécule **3**) a été obtenu avec un rendement de 77%.

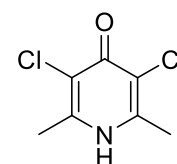


Figure 48 : Structure chimique du clopidol.

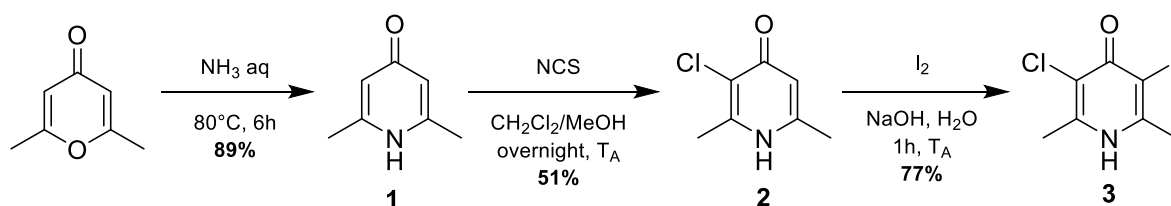


Schéma 5 : Voie de synthèse du synthon a, **3**.

8.2.1.1.2 Synthèse du synthon b

La synthèse de ce synthon démarre par la formation du biaryléther **4** grâce à un couplage de Chan-Lam (Schéma 6). Ce couplage permet de générer une liaison carbone-hétéroatome entre deux systèmes aromatiques à partir d'un acide boronique et d'une fonction comme un phénol, une aniline etc... Cette réaction est possible grâce à l'ajout de cuivre(II) et est favorisée par l'oxygène de l'air car il facilite l'élimination réductive qui conduit à la formation du composé biaryléther voulu.

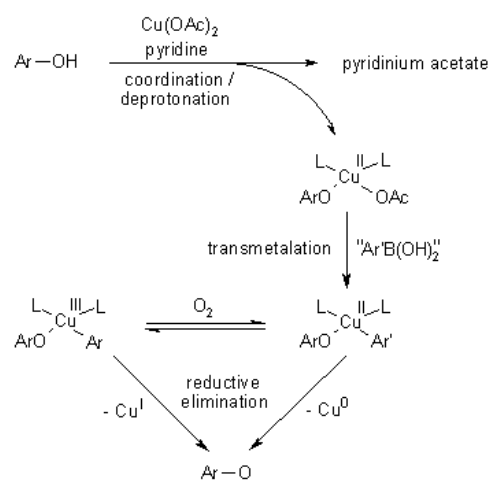


Schéma 6 : Schéma réactionnel du couplage de Chan-Lam.

¹¹³ Glaxo group limited. Novel heterocyclic compounds. WO2006094799, 2006.

Le 4-bromophénol et l'acide [4-(trifluorométhoxy)phényl]boronique ont été mis à réagir en présence de la diisopropyléthylamine (DIPEA), de pyridine et d'acétate de cuivre. Ces conditions ont permis d'obtenir le biaryléther **4** avec 22% de rendement (Schéma 7). Une augmentation de la température (reflux) a conduit à une amélioration du rendement (37%), sans toutefois atteindre la valeur de 63% décrite dans la littérature pour cette réaction.¹¹⁴ Ceci peut s'expliquer par le fait que la réaction est décrite sous pression d'air afin de faciliter l'oxygénation du milieu et donc la réaction. Une amélioration possible consisterait donc à mettre le milieu réactionnel sous pression d'air ambiant (avec un flux continu) ou bien à faire buller de l'air directement dans le milieu pour tenter d'atteindre le rendement décrit. Une autre approche serait l'utilisation d'un agent oxydant comme par exemple le TEMPO (Figure 49) afin de faciliter l'oxydation du cuivre.

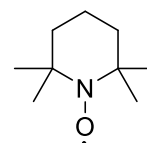


Figure 49 : Structure chimique du TEMPO.

Le biaryléther **4** a ensuite subi un échange halogène-métal à basse température, sous l'action du *n*-butyllithium pour substituer le brome par un atome de lithium. L'action du triisopropylborate sur ce dérivé a alors conduit au transfert de l'ester boronique sur le noyau aryle. Une hydrolyse par ajout d'acide chlorhydrique dilué a permis d'obtenir l'acide boronique **5**, qui correspond au synthon b, avec 88% de rendement.

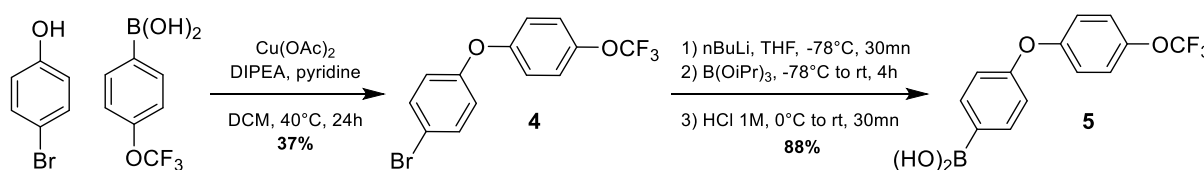


Schéma 7 : Voie de synthèse du synthon b, **5**.

8.2.1.1.3 Synthèse du composé I

Le composé **I** a été synthétisé par un couplage de type Suzuki-Miyaura entre les molécules **3** et **5**, catalysé par l'acétate de palladium (Schéma 8). Les conditions décrites ont permis d'obtenir le composé **I** avec un rendement faible de 17%.¹¹³ De plus, de nombreux sous-produits ont été formés, s'ajoutant à la matière première restante et rendant la purification compliquée. De nouvelles conditions furent retenues après recherche dans la littérature¹¹⁵, notamment le remplacement du DMF par de l'éthanol et l'ajout d'un agent de transfert de phase.

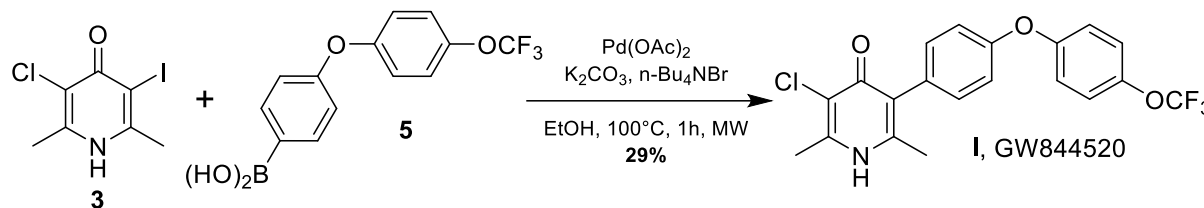


Schéma 8 : Couplage de Suzuki-Miyaura permettant la synthèse de **I**.

¹¹⁴ Medecine for malaria venture, University of South Florida. Compounds having antiparasitic or anti-infectious activity. WO2012167237, 2012.

¹¹⁵ Glaxo group limited. 4(1H)-pyridinone derivatives and their use as antimalaria agents. WO2010081904, 2010.

Celles-ci ont donné le composé **I** avec un rendement amélioré à 29% mais aussi avec un temps de réaction plus court et moins de sous-produits, rendant la purification plus simple. Ce rendement reste toutefois encore améliorable, notamment en purifiant le composé **5** afin de pouvoir éliminer le clopidol. Le rendement global pour la synthèse du composé **I** est de 9%.

8.2.1.2 Vorinostat

Sur la base de résultats préliminaires au sein de l'équipe, il a été montré que des molécules qui sont des inhibiteurs d'histones déacétylases (dont le vorinostat) permettent un retard du retour à la parasitémie initiale lors d'un test de recrudescence sur les parasites quiescents. La molécule est aussi appelée SAHA.

La synthèse du SAHA est simple et peut être réalisée en deux étapes¹¹⁶ (Schéma 9). Un couplage de type peptidique entre la fonction acide carboxylique de l'acide 8-méthoxy-oxooctanoïque et l'aniline, en présence de BOP et d'une base, le DIPEA, a permis de former l'amide **6** avec un rendement de 86%. La seconde étape a consisté à transformer l'ester méthylique en acide hydroxamique, à partir de chlorhydrate d'hydroxylamine. La potasse, présente dans le milieu, permet de générer la forme base de l'hydroxylamine, libérant ainsi le doublet libre de l'azote. Celui-ci attaque le carbonyle de l'ester, formant un intermédiaire hémiacétal. L'élimination du méthanolate est alors possible, en milieu basique, conduisant au SAHA avec un rendement de 79% et un rendement global de 68%.

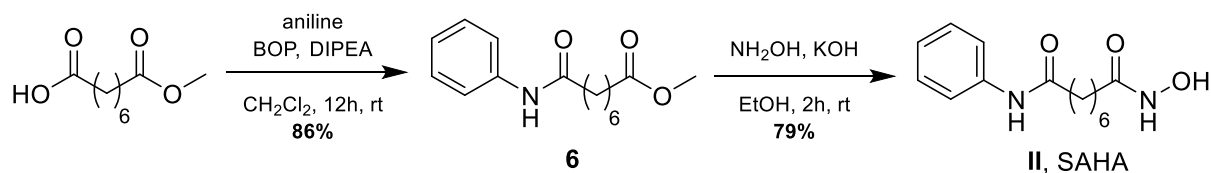


Schéma 9 : Voie de synthèse de **II**, SAHA.

8.2.2 Synthèse d'hybrides présentant le linker alkyl-diester

8.2.2.1 Avec le triclosan

La première molécule active introduite dans cette série est le triclosan (Figure 36). Il a pour avantages :

- La présence d'une fonction alcool permettant de générer le lien ester avec le linker,
- Un poids moléculaire modéré,
- D'être accessible commercialement et à faible coût,

¹¹⁶ Chung Y-M, El-Shazly M, Chuang D-W, Hwang T-L, Asai T, Oshima Y, Ashour ML, Wu Y-C, Chang F-R. Suberoylanilide Hydroxamic Acid, a Histone Deacetylase Inhibitor, Induces the Production of Anti-inflammatory Cyclopeptides from *Beauveria felina*. *J. Nat. Prod.* 2013;76(7):1260-6.

- D'agir sur FabI (voie des acides gras, dans l'apicoplaste), ce qui permettra d'introduire divers inhibiteurs des voies mitochondriales comme second pharmacophore.

Cependant les données scientifiques commencent à mettre en avant les effets toxiques sur l'Homme de ce biocide¹¹⁷ (Schéma 10). Ces données ont poussé la FDA et l'Union Européenne en 2016 et 2017 à interdire le triclosan dans la majorité des produits d'hygiène. Le triclosan reste encore cependant utilisé par exemple dans les dentifrices.

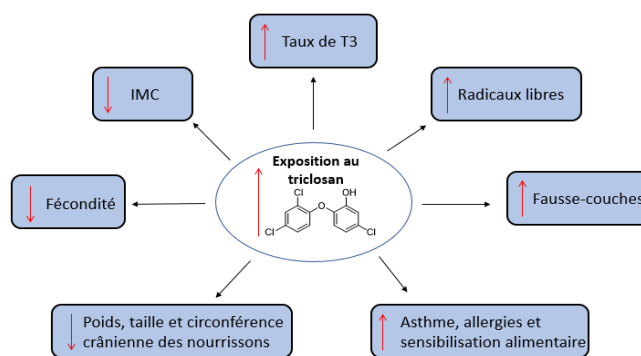


Schéma 10 : Effets observés suite à une hausse de l'exposition au triclosan chez l'Homme. D'après Weatherly et Gosse.¹¹⁷

8.2.2.1.1 Synthèse de l'ester de triclosan 9

L'introduction du triclosan sur le linker de type acide subérique (C8, Schéma 11) nécessite une protection de l'une des 2 fonctions acides carboxyliques de ce dernier. Préalablement à ces travaux, des essais ont été réalisés avec un groupement protecteur de type ester méthylique. Toutefois, suite à la formation de l'ester de triclosan sur la fonction acide carboxylique libre, des conditions correctes de déprotection sélective de l'ester méthylique du linker n'ont pas pu être trouvées.

C'est pourquoi un groupement protecteur benzyle a été choisi, puisqu'une déprotection par hydrogénation catalytique au palladium devrait laisser l'ester de triclosan intact. Ce groupement benzylique a été introduit sur l'acide subérique via une estérification de Steglich¹¹⁸ en présence d'alcool benzylique, de N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide (DCC) et de 4-Diméthylaminopyridine (DMAP). Grâce à l'excès d'acide utilisé ainsi qu'au temps de réaction de court, la protection sur les deux fonctions est limitée et l'ester benzylique **7** est obtenu avec un rendement de 71%.

La fonction acide carboxylique libre a ensuite été activée sous la forme de chlorure d'acide, par l'action du chlorure de thionyle. Le chlorure d'acide étant réactif, il est, une fois isolé, rapidement mis à réagir avec le triclosan en présence de pyridine. La formation du lien ester entre le triclosan et le linker monoprotégé **7** a pu être mise en évidence, par résonance

¹¹⁷ Weatherly LM, Gosse JA. Triclosan exposure, transformation, and human health effects. *J Toxicol Env Heal B*. 2017;20(8):447-69.

¹¹⁸ Neises B, Steglich W. Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. *Angewandte Chemie International Edition in English*. 1978;17(7):522-4.

magnétique nucléaire du proton (RMN ^1H), par l'apparition d'un triplet à 2,49 ppm, correspondant aux 2 hydrogènes portés par le carbone en alpha du carbonyl de l'ester de triclosan. Le produit **8** a été obtenu avec un rendement de 61%.

Enfin le composé **9** a été généré par déprotection de l'éther benzylique par hydrogénation catalytique au palladium et a été obtenu avec un rendement quantitatif.

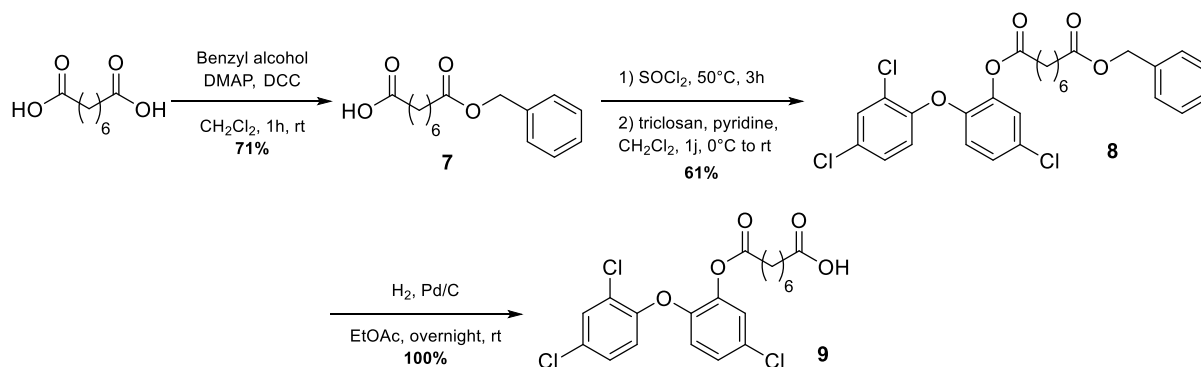


Schéma 11 : Voie de synthèse de l'ester de triclosan **9**.

8.2.2.1.2 Synthèse d'hybrides en série triclosan/linker alkyl diester

Cet ester de triclosan **9** a pu ensuite servir de base à la synthèse de 3 hybrides différents : triclosan-atovaquone **III**, triclosan-clopidol **IV** et triclosan-GW844520 **V**. Les trois pharmacophores associés au triclosan dans ces hybrides sont des inhibiteurs de l'enzyme bc1 au niveau mitochondrial. Le clopidol (Figure 48), une molécule utilisée en médecine vétérinaire et qui possède une activité modérée sur *Plasmodium* (non résistant à l'artémisinine). Il a été utilisé ici en tant que modèle chimique de GW844520 pour la réaction de couplage avec le précurseur **9** (Schéma 12).

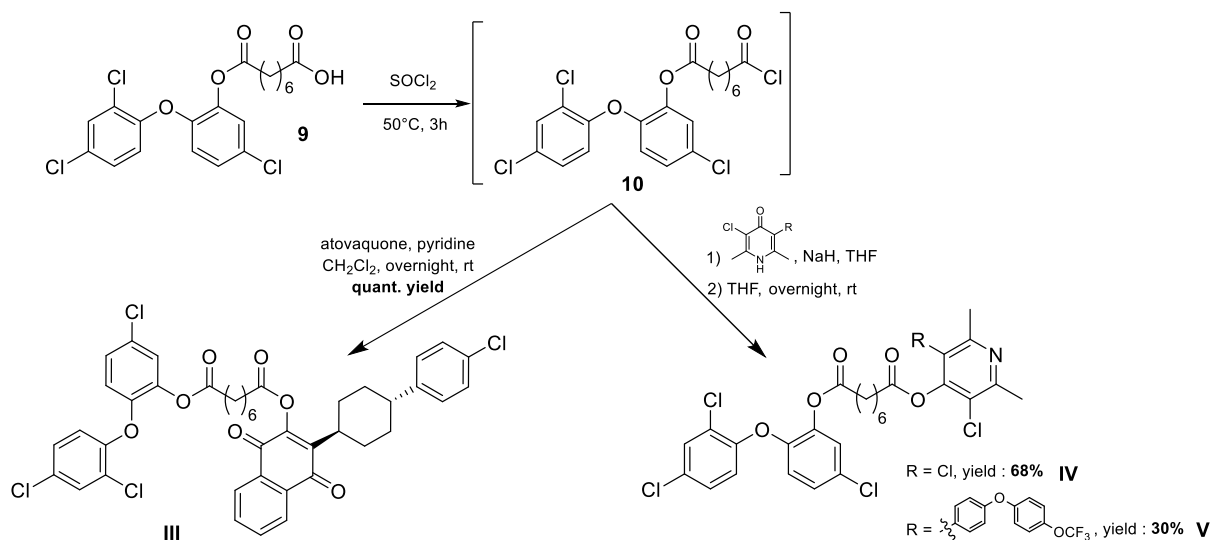


Schéma 12 : Schéma de synthèse des hybrides en série triclosan-linker alkyl diester.

Les conditions précédemment décrites pour générer le chlorure d'acide ont été appliquées à l'intermédiaire **9**. Ce nouveau chlorure d'acide a ensuite été utilisé :

- Avec l'atovaquone, en présence de pyridine pour conduire à l'hybride **III** avec un rendement quantitatif

- Avec le clopidol (en favorisant la forme tautomère phénopyridine grâce à la déprotonation de l'atome d'azote par l'hydrure de sodium, Schéma 13) pour obtenir l'hybride **IV** avec un rendement de 68%.

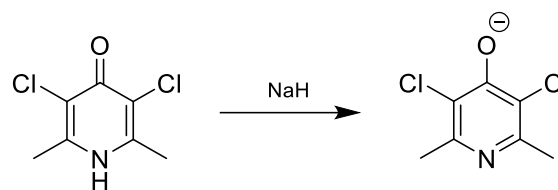


Schéma 13 : Action de l'hydrure de sodium sur le clopidol.

- Avec la molécule **I** (aussi sous forme hydroxypyridine) pour obtenir l'hybride **V** avec un rendement de 30%.

Dans ces trois cas, la formation du produit est visible en RMN ^1H , en plus de l'apparition des signaux correspondant au nouveau pharmacophore, par le déplacement chimique des protons de la chaîne situés sur le carbone en alpha de la fonction ester formée.

Les rendements des deux dernières réactions sont limités par l'étape de déprotonation. Il est possible que malgré l'utilisation d'excès d'hydrure de sodium (5 équivalents avec le clopidol et 2 avec la molécule **I**), cette étape n'ait pas été complète (milieu réactionnel non complètement soluble). L'utilisation de 5 équivalents d'hydrure de sodium avec le composé **I** devrait permettre d'améliorer le rendement final.

8.2.2.2 Avec le vorinostat

Afin de diversifier les pharmacophores et les cibles choisies, le triclosan a ensuite été remplacé par le vorinostat. En effet, la synthèse du vorinostat étant simple et avec un bon rendement, celui-ci a été choisi comme 1^{ère} molécule active introduite lors de la synthèse d'hybrides avec des pharmacophores moins accessibles (atovaquone et GW844520). On obtiendrait ainsi des hybrides ciblant à la fois la voie épigénétique et l'enzyme bcl1 mitochondriale.

8.2.2.2.1 Synthèse du dérivé du vorinostat

L'acide subérique monoprotégé **7** a été utilisé comme précurseur du composé **11**, en suivant les conditions utilisées pour former l'ester de triclosan **9**. L'*O*-acylation du SAHA a d'abord été tenté à l'aide de carbonyldiimidazole sur la base de couplages décrits, impliquant

le vorinostat, dans la littérature.¹¹⁹ Le composé **11** a toutefois été obtenu avec un rendement de 18% et de nombreux sous-produits se sont formés, rendant la purification difficile.

L'acylation du SAHA en présence d'hydrobenzotriazole (HOBt) et de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC)¹²⁰ a permis d'augmenter le rendement de formation de **11** à 33%, ce qui est acceptable au regard de la facilité d'accès aux matières premières. Ensuite, ce composé **11** a subi une hydrogénation catalytique pour libérer la fonction acide mais l'ester de vorinostat déprotégé n'a pas été obtenu (Schéma 14).

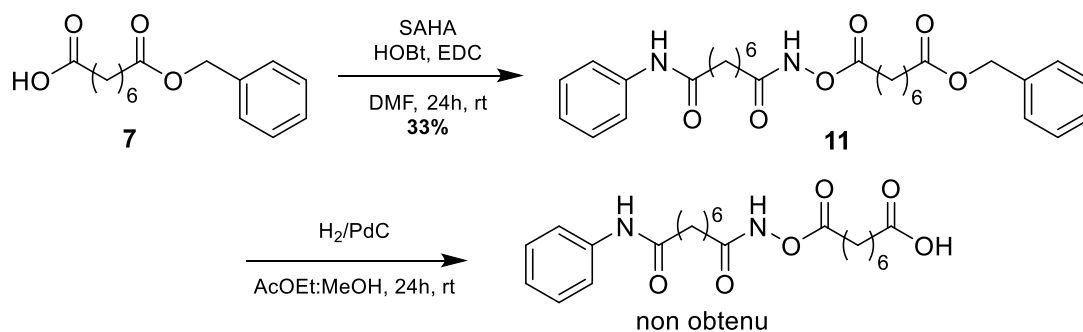


Schéma 14 : Voie de synthèse de l'ester de SAHA.

8.2.3 Synthèse d'hybrides présentant le linker diéthylèneglycol/dicarbonate

8.2.3.1 Synthèse du précurseur triclosan-carbonate/diéthylèneglycol 14

La démarche de la synthèse est similaire à celle utilisée pour le linker alkyl-diester : protection d'une extrémité du linker, addition d'un pharmacophore sur l'autre extrémité, déprotection et addition du second pharmacophore (Schéma 15).

La monoprotection du diéthylèneglycol par un groupement trityl a été réalisée par substitution nucléophile d'une des fonctions alcool sur le chlorure de trityl. L'utilisation du diéthylèneglycol en large excès (solvant) permet d'éviter une di-protection et le linker protégé **12** a été obtenu avec un rendement de 85%.

La fonction carbonate permettant la liaison avec le pharmacophore a ensuite été insérée en deux temps :

- La fonction alcool libre a été convertie en carbonate par l'action du carbonate de disuccinimidyl.
- Le phénol du triclosan attaque le carbonyl du carbonate formé et provoque le départ d'hydroxysuccinimide, en présence de DMAP, pour générer le composé **13** avec un rendement de 35%. Comme dans le cas de l'ester de triclosan **9**, la formation de ce

¹¹⁹ Univ east China science & tech. Dicarboxylic acid derivatives with anti-tumor effect and preparation method thereof. CN102531964, 2012.

¹²⁰ Tazzari V, Cappelletti G, Casagrande M, Perrino E, Renzi L, Del Soldato P, Sparatore A. New aryldithiolethione derivatives as potent histone deacetylase inhibitors. *Bioorg Med Chem.* 2010;18(12):4187-94.

produit est visible en RMN 1H par un net déblindage des protons de la chaîne en alpha du carbonate, vers 4,50 ppm.

Enfin, la déprotection du groupement trityl a été réalisée par l'action du triisopropylsilane en présence d'acide trifluoroacétique, conduisant au composé **14** avec un rendement de 72%.

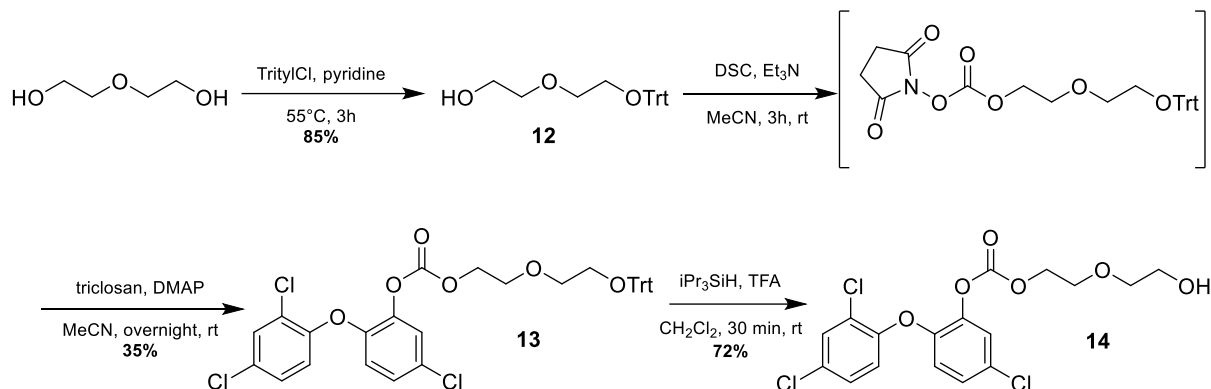


Schéma 15 : Schéma de synthèse du carbonate de triclosan **14**.

Ce précurseur **14** pourra être utilisé pour le couplage avec un second pharmacophore, après conversion de l'alcool libre en carbonate activé. Des travaux préliminaires indiquant une instabilité du lien atovaquone-carbonate, les pharmacophores choisis sont le clopidol et le composé **I**. En effet, il a été montré au laboratoire que le carbonate d'éthyle de clopidol était stable, laissant présager un couplage possible avec le précurseur **14**.

8.2.3.2 Synthèse du précurseur SAHA-carbonate/diéthylène glycol

A partir du composé **12** et comme avec le triclosan, l'introduction du SAHA a été entreprise avec les mêmes conditions. Mais la formation du produit attendu n'a pour le moment pas été prouvée et un des produits réactionnels identifié à la fois en RMN et en spectrométrie de masse correspond au SAHA deshydroxylé (Schéma 16). L'instabilité de cette liaison (comportant beaucoup d'hétéroatomes) entre le SAHA et le carbonate serait donc la cause de l'échec de la réaction.

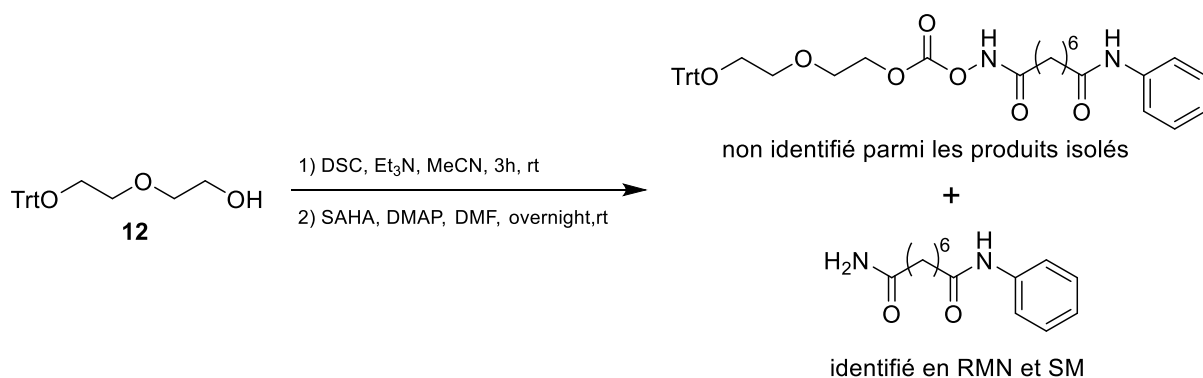


Schéma 16 : Conditions utilisées pour greffer le SAHA sur le linker diéthylène glycol et résultats.

8.3 Résultats biologiques

La molécule **I** ainsi que les hybrides **III**, **IV** et **V** ont subi différents tests biologiques *in vitro* afin de déterminer leur efficacité (le vorinostat a déjà été testé avant ces travaux). L'influence du linker est à chaque fois déterminée par une comparaison contre un mélange équimolaire des molécules actives comprises au sein de l'hybride testé.

8.3.1 Tests de chimiosensibilité

La chimiosensibilité de *P. falciparum* aux différentes molécules est défini via la mesure de l'CI₅₀ sur la souche F32-TEM (non résistante à l'artémisinine).

Tableaux 4 : Valeurs d'IC₅₀ de différentes molécules sur la souche F32-TEM

	CI ₅₀ F32-TEM (nM)
III	0,45 ± 0,5 (n = 4)
Triclosan/Atovaquone	3,1 (n = 1)
IV	2533 ± 898 (n = 4)
V	169 ± 64,9 (n = 4)
Triclosan/ I	26,9 (n = 1)

	CI ₅₀ F32-TEM (nM)
DHA	2,3 ± 1,4 (n = 7)
Artémisinine	16,7 ± 7,9 (n = 10)
Atovaquone	2,4 ± 1,3 (n = 4)
Triclosan	4491 ± 2768 (n = 5)
Clopidol	37145 ± 20736 (n = 3)
I	71,5 ± 21 (n = 4)

Tout d'abord, ces valeurs (Tableaux 4) nous permettent de mettre à l'écart l'hybride **IV**, et son faible effet sur *Plasmodium* (attendu au vu de l'utilisation du clopidol qui n'est pas actif), de la suite des tests biologiques. L'hybride **III** possède une très bonne valeur d'IC₅₀ mais difficile, à ce niveau d'CI₅₀, de mettre en relation avec le mélange triclosan/atovaquone dont le test n'a été effectué qu'une fois. L'hybride **V** possède une bonne valeur d'CI₅₀ cependant on peut déjà remarquer une influence du linker sur celle-ci par rapport au mélange triclosan/**I** (toujours à relativiser car le test n'a été réalisé qu'une seule fois).

8.3.2 Tests de recrudescence

La molécule **I** et les hybrides **III** et **V** ont ensuite subi un test de recrudescence. Les parasites sont exposés pendant 48h à la molécule testée puis on observe le retour à la parasitémie initiale qui est de 3% (jusqu'à 30 jours après l'exposition initiale). Ce test permet de déterminer si la molécule testée possède une résistance croisée avec l'artémisinine et donne une première indication de son activité sur la souche F32-ART.

Tableau 5 : Résultats des tests de recrudescence sur plusieurs molécules. (Moyenne \pm SEM : moyenne \pm erreur type de la moyenne concernant la différence des jours de recrudescence.)

Molécule (7 μ M)	Médiane (intervalle) du jour de recrudescence		Moyenne \pm SEM	<i>P value</i>
	F32-ART	F32-TEM		
III (n = 3)	10 (4-11)	12 (10-19)	5,3 \pm 3,2	0,236
Atovaquone/triclosan (n = 1)	19	22	3	
Atovaquone (n = 3)	14,5 (11-18)	13 (11-19)	-0,5 \pm 0,6	0,848
Triclosan (n = 3)	5 (2-7)	5 (2-6)	-0,2 \pm 0,3	0,423
V (n = 2)	(2-3)	(3-4)	1	
Atovaquone/ I (n = 1)	4	4	0	
I (n = 3)	2 (2-5)	8 (5-10)	4,7 \pm 0,9	0,034
Artémisinine (18 μ M, n = 3)	7 (6-9)	19 (17-20)	11,3 \pm 1,3	0,024

Ces résultats (Tableau 5) montrent que la molécule **I** et l'artémisinine possèdent une résistance croisée. Celle-ci n'est pas expliquée (problèmes de solubilité ?) ; des tests à 20 μ M seront effectués pour voir si ce résultat sera encore présent. De plus la recrudescence avec cette molécule est assez rapide. En revanche, les hybrides **III** et **V** ne possèdent pas de résistance croisée avec l'artémisinine. L'hybride **III** possède une activité moyenne et similaire sur les deux souches tandis que la recrudescence est rapide chez l'hybride **V** (ainsi que chez le mélange atovaquone/**I** le constituant). Des tests à des doses plus importantes seront effectués afin de pouvoir discriminer les deux souches.

8.3.3 Tests QSA

Des tests QSA (cf. Principe du RSA et du QSA) ont été réalisés sur la molécule **I** et sur l'hybride **III**.

Tableau 6 : Résultats des tests QSA pour la molécule **I**.

Conditions (6h/48h)	Molécule I (7 μ M)					
	Jour de recrudescence sur F32-ART					
	Manip 1	Manip 2	Manip 3	Manip 4	Manip 5	Manip 6
DHA/Rien	2	2	2	2	2	2
Rien/ I	5	8	1	5	8	- (Hémolyse)
DHA/ I	8	8	7	6	7	21
DHA/DHA	7	5	5	7	7	7
DHA/DHA + I	9	24	18	9	10	17

Difficile de conclure sur ces résultats pour la molécule **I** (Tableau 6) puisqu'ils se heurtent à un problème de reproductibilité empêchant de déterminer si la molécule est active chez les parasites maintenus en quiescence (en vert sur le Tableau 6) ou non (en rouge).

Tableau 7 : Résultats des tests QSA pour l'hybride **III**.

Conditions (6h/48h)	Moyenne des jours de recrudescence chez F32-ART (n = 3)			
	III (7 μ M)	Triclosan + Atovaquone (7 μ M et 7 μ M)	Triclosan (7 μ M)	Atovaquone (7 μ M)
DHA/Rien	2 \pm 0	2 \pm 0	2 \pm 0	2 \pm 0
Rien/molécule	8 \pm 4	19 \pm 2,6	5,3 \pm 2,1	17,3 \pm 2,5
DHA/molécule	9,7 \pm 0,6	17,3 \pm 1,5	6,3 \pm 2,5	18,3 \pm 3,2
DHA/DHA	6 \pm 1,7	6 \pm 1,7	6 \pm 1,7	5,6 \pm 0,5
DHA/DHA+molécule	10,7 \pm 1,2	20,3 \pm 1,5	7 \pm 2,6	19 \pm 2,6

Concernant l'hybride **III**, les résultats (Tableau 7) nous permettent de conclure que pour cet hybride :

- L'introduction du linker diminue fortement l'activité de l'hybride, contre les parasites maintenus en quiescence, par rapport au mélange des deux molécules (passage de 20 à 10 jours pour le moment de recrudescence).
- L'utilisation du triclosan semble inutile car le mélange triclosan/atovaquone est à peine plus actif que l'atovaquone seule (20 jours contre 19).

Cette perte d'activité de l'hybride par rapport au mélange suggérerait une faible dissociation de l'atovaquone au linker (fonction ester trop stable ? trop encombrée ?), hypothèse qui mériterait d'être explorée afin de, si besoin, chercher une autre fonction pour incorporer l'atovaquone dans des hybrides.

9 Conclusion et perspectives

Deux molécules actives d'intérêt contre les parasites quiescents ont pu être synthétisées. Le composé **I** avec une bonne CI_{50} possède des résultats de recrudescence (résistance croisée avec l'artémisinine) et de QSA (problème de reproductibilité) nécessitant des tests supplémentaires. Le composé **II** a été synthétisé suite aux résultats prometteurs au sein de l'équipe. Ces deux molécules ont pu ensuite être utilisées pour la synthèse d'hybrides.

Trois hybrides (**III**, **IV** et **V**) ont été synthétisés et caractérisés. Suite aux tests d' CI_{50} , les hybrides **III** et **V** ont été testés dans des expériences approfondies. Le test de recrudescence pour ces deux hybrides ne montre pas de résistance croisée. L'hybride **V** montre une faible activité sur F32-ART dans ce test. Le test QSA pour l'hybride **III** révèle que l'utilisation du triclosan est inefficace contre les parasites maintenus en quiescence (contrairement à ce que pouvait laisser penser les travaux de Chen *et al.*⁸¹) et que la fonction ester entre le linker et l'atovaquone semble difficile à se rompre.

La synthèse sur la série alkyl-diester s'est montrée peu problématique. La limitation majeure est l'accessibilité de certains pharmacophores (atovaquone, composé **I**). Pour la série diéthylèneglycol-dicarbonat, les problèmes sont surtout dus à la moindre stabilité de la fonction carbonat.

Le composé **14** constitue un précurseur pour la synthèse d'hybrides supplémentaires, sur lesquels l'introduction du clopidol ou du composé **I** permettra de faire la comparaison entre le linker alkyl-diester et diéthylèneglycol-dicarbonat. Les composés à base de vorinostat, malgré leur intérêt en termes d'activité, risquent de poser un problème de par la fragilité de l'acide hydroxamique. Cette fonction apparait facilement labile durant les différentes réactions testées (Schéma 14 et Schéma 15). De plus l'activité de la molécule est portée par la fonction acide hydroxamique. Une rupture comme celle-ci, qui a pu être observée lors des essais pour greffer le SAHA sur le linker diéthylèneglycol-dicarbonat (Schéma 16), libérerait un composé amide, non actif. Toutefois, cette stratégie reste envisageable puisque des prodrogues de SAHA porteurs d'une fonction acyle sont décrites dans la littérature.¹²¹

Les résultats actuels ne permettent pas encore d'affirmer la pertinence de cette stratégie pour éliminer les parasites quiescents mais ils n'indiquent pas non plus qu'elle soit complètement inefficace.

¹²¹ Tazzari V, Cappelletti G, Casagrande M, Perrino E, Renzi L, Del Soldato P, Sparatore A. New aryldithiolethione derivatives as potent histone deacetylase inhibitors. *Bioorg Med Chem.* 2010;18(12):4187-94.

A moyen terme, les travaux pourront s'orienter sur la pharmacomodulation du linker (fonction terminale, nature, longueur) et sur l'étude des différentes molécules d'intérêt (cf. Molécules et cibles d'intérêt contre les parasites quiescents) une fois leur synthèse réalisée ; tout ça dans le but de synthétiser de nouveaux hybrides.

A plus long terme, dans l'hypothèse qu'un composé efficace puisse être obtenu, l'hybride serait alors utilisé en combinaison avec un dérivé d'artémisinine afin de pouvoir obtenir une thérapie luttant contre les parasites résistants. Le développement de ces molécules devra aussi suivre avec attention les nouvelles données que les chercheurs pourront obtenir sur la protéine *Pfkelch13* et les voies en découlant. Malheureusement, même si cela devait arriver, le temps de développer une molécule efficace contre cette résistance (via cette approche ou par une autre) sera long (par exemple, la ferroquine publiée en 1998 vient de finir son essai de phase II en 2018). Durant ce laps de temps, le développement de protocoles de soins innovants comme les TACTs et le renforcement de la prévention sur le terrain devra permettre de contenir cette résistance à l'Asie du Sud-Est. La surveillance des souches parasitaires sur les autres continents devra se poursuivre afin de pouvoir réagir le plus tôt possible à une possible transmission de la résistance dans de nouveaux pays. L'émergence de cette résistance (couplée à la perte d'efficacité des insecticides sur le vecteur) met à mal les objectifs à long terme de l'OMS de réduction de la prévalence et de la mortalité due au paludisme dans le monde et menace des centaines de millions de personnes dans des pays souvent pauvres et subissant déjà l'effet du paludisme et d'autres maladies endémiques sur leur développement.

10 Partie expérimentale

10.1 Matériels

Tous les produits obtenus commercialement ont été utilisés sans purification supplémentaire. Les autres réactifs ont été utilisés tels que fournis par les compagnies chimiques. Toutes les réactions impliquant des réactifs sensibles à l'eau ou l'air ont été réalisées sous atmosphère d'argon en utilisant des seringues et des septums.

Les spectres RMN ont été obtenus à partir d'un Bruker AVANCE III 400 MHz Spectrometer (400 MHz pour ^1H , 100 MHz pour ^{13}C and 376.1 MHz pour ^{19}F) et d'un Bruker AVANCE III 300 MHz Spectrometer (300 MHz pour ^1H , 75 MHz pour ^{13}C), dans le chloroforme-d (CDCl_3), méthanol-d4 (CD_3OD) ou le DMSO-d6 ($\text{C}_2\text{D}_6\text{SO}_2$). Le signal résiduel des solvants deutérés a été utilisé comme référence interne : CDCl_3 $\delta = 7.26$ ppm pour ^1H et 77.16 pour ^{13}C , CD_3OD $\delta = 3.31$ ppm pour ^1H et 49.00 pour ^{13}C et DMSO $\delta = 2.50$ ppm pour ^1H et 39.52 pour ^{13}C . Les données des spectres sont rapportées de la manière suivante : déplacement chimique (δ) écrite en parties par million (ppm), multiplicité (décrite de la manière suivante : s, singulet ; d, doublet ; t, triplet ; q, quadruplet ; p, quintuplet ; m, multiplet ; dd, doublet de doublet ; tt, triplet de triplet), constantes de couplage (J) écrites en Hertz (Hz) et l'intégration.

Les spectres infrarouges ont été obtenu à partir d'un PERKIN-ELMER FT-IR spectrometer et ont été écrits en terme de fréquence d'absorption (cm^{-1}). Les données sont rapportées comme étant des vibrations d'étirement (ν). Les spectres de masse par électrospray (ESI) ont été obtenus à partir d'un Perkin-Elmer SCIEX API 365 instrument et les spectres de masse par ionisation chimique (DCI) à partir d'un Finnigan TQS 7000 spectrometer.

Les points de fusion (T_f) ont été déterminés sur un Stuart SMP50. Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été faites sur des feuilles pré-recouvertes de gel de silice 60F254. La révélation a été faite à l'aide d'une lampe UV. Du gel de silice de grade technique 0.063-0.200 mm-60 Å a été utilisé pour toutes les colonnes chromatographiques.

La nomenclature IUPAC é été utilisée pour tous les composés.

10.2 Molécules synthétisées

La structure chimique des molécules est disponible à l'Annexe 29.

10.2.12,6-Diméthylpyridin-4(1H)-one 1

Une solution de 2,6-diméthyl-4*H*-pyran-4-one (0,6 g, 4,8 mmol) dans l'ammoniaque aqueux a été agitée à 80°C dans un ballon scellé de 250 mL pendant 6h. Après agitation supplémentaire à température ambiante pendant une journée, le solvant en excès a été évaporé sous vide, permettant d'obtenir la 2,6-diméthyl-4(1*H*)-pyridinone **1** sous la forme d'un solide blanc (0,532 g, 89% de rendement). ¹H NMR (DMSO, 400 MHz) δ 11,11 (s, 1H), 5,84 (s, 2H), 2,16 (s, 6H). ¹³C NMR (DMSO, 100 MHz) δ 178,8 (Cq), 147,7 (2 Cq), 114,4 (2 CH), 19,3 (2 CH₃). (LR-MS (DCI/NH₃) m/z = 124,1 (M+H⁺), 141,2 (M+NH₄⁺).

10.2.23-Chloro-2,6-diméthylpyridin-4(1H)-one 2

A une solution de 2,6-diméthylpyridin-4(1*H*)-one **1** (0,73 g, 5,9 mmol) dans du dichlorométhane (20 mL) et le méthanol (8 mL) sous atmosphère d'azote N₂ a été ajoutée du N-chlorosuccinimide (1,03 g, 7,7 mmol). Le mélange a été agité à température ambiante pendant la nuit. Après élimination du solide par une filtration, le filtrat a été concentré sous vide. Le solide en résultant a été lavé avec de l'acétonitrile, filtré et séché sous vide permettant d'obtenir la 3-chloro-5-iodo-2,6-diméthylpyridin-4(1*H*)-one **2** sous la forme d'un solide blanc (0,476g, 51% de rendement) utilisé sans purification supplémentaire. ¹H NMR (DMSO, 400 MHz) δ 11,55 (s, 1H), 6,01 (s, 1H), 2,33 (s, 3H), 2,19 (s, 3H). ¹³C NMR (DMSO, 100 MHz) δ 172,4 (Cq), 146,3 (Cq), 144,7 (Cq), 120,7 (Cq), 113,9 (CH), 18,7 (CH₃), 17,9 (CH₃). LR-MS (DCI/NH₃) m/z = 158,0 (M+H⁺), 175,1 (M+NH₄⁺).

10.2.33-Chloro-5-iodo-2,6-diméthylpyridin-4(1H)-one 3

A une solution d'hydroxyde de sodium (0,12 g) dans l'eau (18,5 mL) a été ajoutée portion par portion de la 3-chloro-2,6-diméthylpyridin-4(1*H*)-one **2** (0,48 g, 3,02 mmol). Du diiode (0,77 g, 3,02 mmol) a ensuite été ajouté et le mélange a été agité pendant 1h à température ambiante. Le mélange réactionnel a été filtré et la précipité a été lavé avec de l'eau (2 x 10 mL) et de l'acétonitrile (2 x 10 mL). Le précipité a été séché sous vide permettant d'obtenir la 3-chloro-5-iodo-2,6-diméthylpyridin-4(1*H*)-one **3** sous la forme d'un solide blanc (0,856 g, 77% de rendement) utilisé sans purification supplémentaire. ¹H NMR (DMSO, 300 MHz) δ 11,97 (br s, 1H), 2,48 (s, 3H), 2,35 (s, 3H). ¹³C NMR (DMSO, 75 MHz) δ 168,7 (Cq), 147,9 (Cq), 143,7 (Cq), 115,9 (Cq), 92,7 (Cq), 24,6 (CH₃), 17,2 (CH₃). LR-MS (DCI/NH₃) m/z = 283,9 (M+H⁺), 301,0 (M+NH₄⁺).

10.2.41-Bromo-4-[4-(trifluorométhoxy)phénoxy]benzène 4

A une solution de 4-bromophénol (0,42g, 2,4 mmol) dans le dichlorométhane (25 mL) a été ajoutée de l'acide [4-(trifluorométhoxy)phényl]boronique (1,00 g, 4,8 mmol). Après

dissolution, du tamis moléculaire a été ajouté au mélange, suivi par de l'acétate de cuivre (II) monohydrate (0,48 g, 2,4 mmol), de la *N,N*-diisopropyléthylamine (2 mL, 12,1 mmol) et de la pyridine (1 mL, 12,1 mmol). Le mélange a été agité à 40°C pendant un jour puis deux jours à température ambiante. Le solvant en excès a été éliminé sous vide et de l'acétate d'éthyle (100 mL) a été ajouté au résidu. La phase organique obtenue a été lavée avec une solution d'acide chlorhydrique à 0,5M (60 mL). La phase aqueuse a été extraite avec de l'acétate d'éthyle (75 mL) et les phases organiques ont été combinées, séchées avec du sulfate de sodium anhydre et le solvant en excès a été évaporé sous vide. Le produit brut a été purifié par colonne chromatographique sur gel de silice (100% *n*-hexane) permettant d'obtenir le 1-bromo-4-[4-(trifluorométhoxy)phénoxy]benzène **4** sous la forme d'une huile transparente (0,300 g, 37% de rendement). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 7,45 (d, ³J = 9 Hz, 2H), 7,23-7,17 (m, 2H), 7,03-6,98 (m, 2H), 6,90 (d, ³J = 9 Hz, 2H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 156,2 (Cq), 155,5 (Cq), 114,9 (Cq), 133,0 (2 CH), 122,9 (2 CH), 120,8 (2 CH), 120,6 (q, ¹J (C-F) = 257 Hz, Cq), 119,9 (2CH), 116,5 (Cq). LR-MS (DCI/NH₃) m/z = 332,1 (M⁺).

10.2.5 Acide {4-[4-(trifluorométhoxy)phénoxy]phényl}boronique **5**

A une solution de 1-Bromo-4-[4-(trifluorométhoxy)phénoxy]benzène **4** (0,2 g, 0,6 mmol) dans du tétrahydrofurane anhydre (5 mL), sous atmosphère d'argon, à -78°C a été ajoutée goutte à goutte une solution de *n*-butyllithium dans l'hexane à 1,6M (0,47 mL, 0,75 mmol) et le mélange a été agité pendant 30 min à -78°C. Du triisopropylborate (0,28 mL, 1,2 mmol) a ensuite été ajouté et le mélange a été agité pendant 4h à température ambiante. Le mélange réactionnel a été refroidi à 0°C et une solution d'acide chlorhydrique à 1M (5 mL) a été ajoutée et le mélange a été agité pendant 30 min, avant d'être extrait avec de l'acétate d'éthyle (3 x 10 mL). Les phases organiques combinées ont été lavées avec de la saumure (2 x 30 mL), séchées avec du sulfate de sodium anhydre et le solvant en excès a été évaporé sous vide. Le produit brut a été purifié par colonne chromatographique sur gel de silice (dichlorométhane/méthanol, de 100/0 à 98/2) permettant d'obtenir l'acide {4-[4-(trifluorométhoxy)phénoxy]phényl}boronique **5** sous la forme d'une huile jaune (0,158 g, 88% de rendement). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 8,20 (d, ³J = 9 Hz, 2H), 7,24-7,16 (m, 2H), 7,13-7,05 (m, 4H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 161,2 (Cq), 154,9 (Cq), 145,3 (Cq), 137,9 (2 CH₂), 135,7 (Cq), 122,9 (2 CH₂), 120,8 (2 CH₂), 119,4 (q, ¹J (C-F) = 257 Hz, Cq), 117,9 (2 CH₂). LR-MS (DCI/NH₃) m/z = 338,3 (M+NaNH₄⁺), 355,4 (M+Na+2(NH₄⁺)).

10.2.63-Chloro-2,6-diméthyl-5-{4-[4-(trifluorométhoxy)phénoxy]phényl}pyridin-4(1H)-one I

A une solution de 3-Chloro-5-iodo-2,6-diméthylpyridin-4(1H)-one **3** (0,159 mg, 0,56 mmol) dans l'éthanol (5 mL) a été ajoutée de l'acide {4-[4-(trifluorométhoxy)phénoxy]phényl}boronique **5** (0,25 g, 0,84 mmol), du carbonate de potassium (0,349 g, 2,5 mmol) et du bromure de tétrabutylammonium (9 mg, 0,018 mmol). Le mélange a été désoxygéné en faisant bullé de l'argon pendant 10 min, puis de l'acétate de palladium (9 mg, 0,018 mmol) a été ajouté et le milieu réactionnel a été chauffé à 100°C aux micro-ondes (mode dynamique, puissance maximale) pendant 30 min puis agité à température ambiante pendant la nuit. De l'eau (10 mL) a été ajouté au mélange réactionnel, qui a été extrait avec de l'acétate d'éthyle (3 x 10 mL). Les phases organiques combinées ont été lavées avec de l'eau (2 x 30 mL), séchées avec du sulfate de magnésium anhydre et le solvant en excès a été évaporé sous vide. Le produit brut obtenu a été purifié par colonne chromatographique sur gel de silice (dichlorométhane/méthanol, de 100/0 à 98/2) permettant d'obtenir la 3-Chloro-2,6-diméthyl-5-{4-[4-(trifluorométhoxy)phénoxy]phényl}pyridin-4(1H)-one **I** sous la forme d'un solide blanc (65 mg, 29% de rendement). ¹H NMR (DMSO, 400 MHz) δ 11,59 (br s, 1H), 7,41 (d, ³J = 8 Hz, 2H), 7,23 (d, ³J = 8 Hz, 2H), 7,16 (d, ³J = 8 Hz, 2H), 7,06 (d, ³J = 8 Hz, 2H), 2,38 (s, 3H), 2,10 (s, 3H). ¹³C NMR (DMSO, 100 MHz) δ 170,5 (Cq), 155,7 (Cq), 155,0 (Cq), 143,7 (Cq), 143,4 (Cq), 142,8 (Cq), 132,3 (2 CH), 131,4 (Cq), 124,9 (Cq), 123,0 (2 CH), 120,4 (Cq), 120,1 (q, ¹J (C-F) = 254 Hz, Cq), 119,9 (2 CH), 118,2 (2 CH), 17,7 (CH₃), 17,5 (CH₃). ¹⁹F NMR (DMSO, 376 MHz) δ -57,17 (s). IR ν 3050, 2941, 1618, 1527, 1236, 860. HR-MS (DCI/CH₄) m/z calculée pour C₂₀H₁₆ClF₃NO₃ (M+H⁺) 410.0765, trouvée 410.0771. T_f : supérieure à 300°C.

10.2.78-anilino-8-oxooctanoate de méthyle **6**

A une solution d'acide 8-méthoxy-8-oxooctanoïque (1 g, 5,3 mmol) dans du dichlorométhane sec (30 mL) a été ajoutée de l'aniline (0,495 g, 5,3 mmol), de la *N,N*-diisopropyléthylamine (2,8 mL, 15,9 mmol) et une solution de (benzotriazol-1-yloxy)tris(diméthylamino)phosphonium hexafluorophosphate (2,35 g, 5,3 mmol) dans du dichlorométhane sec (3 mL) et le mélange a été agité pendant 12h à température ambiante. Le solvant en excès a été évaporé sous vide et le produit brut obtenu a été purifié par colonne chromatographique sur gel de silice (*n*-hexane/acétate d'éthyle, de 90/10 à 80/20) permettant d'obtenir le 8-anilino-8-oxooctanoate de méthyle **6** sous la forme d'un solide blanc (1,21 g, 86% de rendement). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 7,51 (d, ³J = 8 Hz, 2H), 7,30 (t, ³J = 8 Hz, 2H), 7,14-7,03 (m, 1H), 3,66 (s, 3H), 2,41-2,22 (m, 4H), 1,80-1,53 (m, 4H), 1,46-1,29 (m, 4H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 174,4 (Cq), 171,4 (Cq), 138,1 (Cq), 129,1 (2 CH), 124,3 (CH),

119,9 (2 CH), 51,6 (CH₃), 37,7 (CH₂), 34,1 (CH₂), 28,9 (CH₂), 28,9 (CH₂), 25,5 (CH₂), 24,8 (CH₂).

10.2.8 *N*¹-Hydroxy-*N*⁸-phenyloctanediamide II

A une solution d'hydroxyde de potassium (2,58 g, 45,9 mmol) dans du méthanol (10 mL) chauffée à 40°C a été ajoutée une solution de chlorhydrate d'hydroxylamine (3,19 g, 45,9 mmol) dans du méthanol (20 mL) et la solution obtenue a été refroidie à température ambiante. Le mélange a été filtré du 8-anilino-8-oxooctanoate de méthyle **6** (1,21 g, 4,6 mmol) et de l'hydroxyde de potassium (2,06 g, 36,7 mmol) ont été ajoutés au filtrat et la solution obtenue a été agitée à température ambiante pendant 3h. Le mélange a été filtré et le filtrat concentré sous vide. Le brut obtenu a été lavé avec du dichlorométhane (40 mL) permettant d'obtenir le *N*¹-hydroxy-*N*⁸-phenyloctanediamide **II** sous la forme d'un solide beige (0,96 g, 79% de rendement). ¹H NMR (DMSO, 400 MHz) δ 10,33 (br s, 1H), 9,84 (br s, 1H), 8,66 (br s, 1H), 7,58 (d, ³J = 8 Hz, 2H), 7,27 (t, ³J = 8 Hz, 2H), 7,04-6,98 (m, 1H), 2,28 (t, ³J = 7 Hz, 2H), 1,93 (t, ³J = 7 Hz, 2H), 1,57 (p, ³J = 7 Hz, 2H), 1,48 (p, ³J = 7 Hz, 2H), 1,34-1,20 (m, 4H). ¹³C NMR (DMSO, 100 MHz) δ 171,2 (Cq), 169,0 (Cq), 139,3 (Cq), 128,6 (2 CH), 122,9 (CH), 119,0 (2 CH), 36,4 (CH₂), 32,2 (CH₂), 28,4 (CH₂), 28,4 (CH₂), 25,0 (CH₂), 25,0 (CH₂). IR ν HRMS (ES⁻) m/z calculée pour C₁₄H₁₉N₂O₃ (M-H⁻) 263.1396, trouvée 263.1401. T_f : 160 °C.

10.2.9 Acide 8-(Benzyloxy)-8-oxooctanoïque **7**

A une solution d'acide octanedioïque (1 g, 5,7 mmol) et d'alcool benzylique (0,31 g, 2,9 mmol) dans du dichlorométhane (25 mL) a été ajoutée de la 4-diméthylaminopyrimidine (0,39 g, 3,2 mmol) et du *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (0,66 g, 3,2 mmol) et le mélange a été agité à température ambiante pendant 1h. Le solvant en excès a été éliminé sous vide. Au résidu obtenu a été ajouté de l'eau (40 mL) et le mélange a été extrait avec de l'acétate d'éthyle (3 x 40 mL). Les phases organiques combinées ont été lavées avec de l'eau (2 x 75 mL) et un solide a été éliminé par filtration. Le filtrat a été concentré sous vide. Le produit brut obtenu a été purifié par colonne chromatographique sur gel de silice (cyclohexane/acétate d'éthyle, 80/20) permettant d'obtenir l'acide 8-(benzyloxy)-8-oxooctanoïque **7** sous la forme d'un solide translucide (0,545 g, 71% de rendement). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 7,39-7,30 (m, 5H), 5,11 (s, 2H), 2,38-2,31 (m, 4H), 1,70-1,58 (m, 4H), 1,37-1,31 (m, 4H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 178,9 (Cq), 173,7 (Cq), 136,2 (Cq), 128,7 (2 CH), 128,3 (3 CH), 66,3 (CH₂), 34,4 (CH₂), 33,9 (CH₂), 28,8 (CH₂), 28,8 (CH₂), 24,9 (CH₂), 24,6 (CH₂). LR-MS (DCI/NH₃) m/z = 265,2 (M+H⁺) 282,2 (M+NH₄⁺).

10.2.10 **5-Chloro-2-(2,4-dichlorophénoxy)phényle octanedioate de benzyle 8**

A de l'acide 8-(benzyloxy)-8-oxooctanoïque **7** (0,55 g, 2,1 mmol) a été ajouté du chlorure de thionyle (0,75 mL, 10,3 mmol) et le mélange réactionnel a été agité à 50°C pendant 3h. L'excès de SOCl₂ a été éliminé par des évaporations répétées avec du dichlorométhane sec (15 mL) sous vide. Le résidu obtenu a été dissous dans du dichlorométhane sec (15 mL), refroidi à 0°C et du triclosan (0,60 g, 2,1 mmol) et de la pyridine (0,33 mL, 4,1 mmol) ont été ajoutés. Le mélange a été agité à température ambiante pendant 1 jour. Le solvant en excès a été évaporé sous vide et le produit brut a été purifié par colonne chromatographique sur gel de silice (dichlorométhane/méthanol, de 100/0 à 95/5) puis par colonne chromatographique sur oxyde d'alumine (neutre, activité IV) (cyclohexane/acétate d'éthyle, 90/10) permettant d'obtenir le 5-Chloro-2-(2,4-dichlorophénoxy)phényle octanedioate de benzyle **8** sous la forme d'une huile jaune (0,672 g, 61% de rendement). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 7,44 (d, ⁴J = 4 Hz, 1H), 7,40-7,30 (m, 5H), 7,21-7,12 (m, 3H), 6,88-6,80 (m, 2H), 5,11 (s, 2H), 2,45 (t, ³J = 8 Hz, 2H), 2,33 (t, ³J = 8 Hz, 2H), 1,71-1,57 (m, 4H), 1,40-1,24 (m, 4H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 173,6 (Cq), 171,2 (Cq), 151,2 (Cq), 146,7 (Cq), 142,0 (Cq), 136,2 (Cq), 130,5 (CH), 129,5 (Cq), 129,5 (Cq), 128,7 (2 CH), 128,3 (3 CH), 128,3 (CH), 127,1 (CH), 125,9 (Cq), 124,6 (CH), 120,4 (CH), 120,3 (CH), 66,3 (CH₂), 34,3 (CH₂), 33,9 (CH₂), 28,8 (CH₂), 28,7 (CH₂), 24,8 (CH₂), 24,7 (CH₂). LR-MS (DCI/CH₄) m/z = 534,1 (M⁺), 563,1 (M+C₂H₅⁺), 575,1 (M+C₃H₅⁺).

10.2.11 **Acide 8-[5-Chloro-2-(2,4-dichlorophénoxy)phénoxy]-8-oxooctanoïque 9**

A une solution de 5-Chloro-2-(2,4-dichlorophénoxy)phényle octanedioate de benzyle **8** (0,67g, 1,3 mmol) dans de l'acétate d'éthyle (84 mL) a été ajoutée du palladium (10% masse sur charbon) (67 mg). Le mélange réactionnel a été placé sous atmosphère d'hydrogène (1 bar) et a été agité à température ambiante pendant 1 jour. Le mélange réactionnel a été filtré sur de la célite pour éliminer le palladium, et le filtrat a été concentré sous vide permettant d'obtenir l'acide 8-[5-Chloro-2-(2,4-dichlorophénoxy)phénoxy]-8-oxooctanoïque **9** pur sous la forme d'un solide jaunâtre (0,562 g, rendement quantitatif). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 7,45 (d, ⁴J = 3 Hz, 1H), 7,21-7,17 (m, 2H), 7,17-7,14 (m, 1H), 6,88-6,81 (m, 2H), 2,48 (t, ³J = 7 Hz, 2H), 2,33 (t, ³J = 7 Hz, 2H), 1,72-1,52 (m, 4H), 1,42-1,30 (m, 4H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 178,7 (Cq), 171,2 (Cq), 151,2 (Cq), 146,7 (Cq), 142,1 (Cq), 130,5 (CH), 129,5 (Cq), 129,5 (Cq), 128,3 (CH), 127,1 (CH), 125,9 (Cq), 124,6 (CH), 120,5 (CH), 120,3 (CH), 33,9 (CH₂), 33,8 (CH₂), 28,7 (CH₂), 28,7 (CH₂), 24,7 (CH₂), 24,6 (CH₂). LR-MS (DCI/CH₄) m/z = 444,0 (M⁺), 445,0 (M+H⁺), 473,1 (M+C₂H₅⁺).

10.2.12 **8-Chloro-8-oxooctanoate de 5-chloro-2-(2,4-dichlorophénoxy)phényle 10**

A l'acide 8-[5-Chloro-2-(2,4-dichlorophénoxy)phénoxy]-8-oxooctanoïque **9** (0,1 g, 0,22 mmol) a été ajouté du chlorure de thionyle (0,081 mL, 1,1 mmol) et le mélange a été agité à 50°C pendant 3h. L'excès de SOCl₂ a été éliminé par des évaporations répétées avec du dichlorométhane sec (15 mL) sous vide permettant d'obtenir le 8-Chloro-8-oxooctanoate de 5-chloro-2-(2,4-dichlorophénoxy)phényle **10** sous la forme d'une huile orange qui a été utilisée sans purification supplémentaire ou caractérisation.

10.2.13 **3-[(1r,4r)-4-(4-Chlorophényl)cyclohexyl]-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-yl octanedioate de 5-chloro-2-(2,4-dichlorophénoxy)phényle III**

A une solution de 8-Chloro-8-oxooctanoate de 5-chloro-2-(2,4-dichlorophénoxy)phényle **10** (0,102 g, 0,22 mmol) dans le dichlorométhane sec (1,5 mL) a été ajoutée de la pyridine (0,036 mL, 0,45 mmol) et de l'atovaquone (82 mg, 0,22 mmol) et le mélange a été agité à température ambiante pendant 1 jour. L'excès de solvant a été évaporé sous vide et le brut obtenu a été purifié par colonne chromatographique sur gel de silice (100% dichlorométhane) permettant d'obtenir le 3-[(1r,4r)-4-(4-Chlorophényl)cyclohexyl]-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-yl octanedioate de 5-chloro-2-(2,4-dichlorophénoxy)phényle **III** sous la forme d'un solide jaune (0,178 g, rendement quantitatif). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 8,15-8,05 (m, 2H), 7,79-7,68 (m, 2H), 7,45 (d, ⁴J = 2 Hz, 1H), 7,29-7,24 (m, 2H), 7,20-7,13 (m, 5H), 6,86-6,83 (m, 2H), 3,07 (tt, ³J = 12 Hz, ⁴J = 4 Hz, 1H), 2,70 (t, ³J = 8 Hz, 2H), 2,59 (tt, ³J = 12 Hz, ⁴J = 4 Hz, 1H), 2,52 (t, ³J = 8 Hz, 2H), 2,07-1,93 (m, 4H), 1,87-1,77 (m, 4H), 1,72 (p, ³J = 8 Hz, 2H), 1,61-1,40 (m, 6H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 184,7 (Cq), 178,4 (Cq), 171,4 (Cq), 171,1 (Cq), 151,2 (Cq), 151,1 (Cq), 146,7 (Cq), 145,6 (Cq), 142,0 (Cq), 141,9 (Cq), 134,2 (CH), 133,8 (CH), 132,5 (Cq), 131,8 (Cq), 130,8 (Cq), 130,5 (CH), 129,5 (Cq), 129,5 (Cq), 128,6 (2 CH), 128,3 (CH), 128,2 (2 CH), 127,1 (CH), 127,1 (CH), 126,6 (CH), 125,8 (Cq), 124,6 (CH), 120,5 (CH), 120,3 (CH), 43,4 (CH), 36,1 (CH), 34,4 (2 CH₂), 34,0 (CH₂), 33,9 (CH₂), 30,1 (2 CH₂), 28,8 (CH₂), 28,2 (CH₂), 24,7 (CH₂), 24,7 (CH₂). IR ν 2939, 2860, 1754, 1681, 1661, 1474, 1257, 1094, 938, 824, 709, 530. HR-MS (DCI/CH₄) m/z calculée pour C₄₂H₃₆Cl₄O₇ (M⁺) 792.1215, trouvée 792.1212. T_f : 109°C.

10.2.14 **3,5-Dichloro-2,6-diméthylpyridin-4-yl octanedioate de 5-chloro-2-(2,4-dichlorophénoxy)phényl IV**

A une solution de clopidol (43 mg, 0,22 mmol) dans le tétrahydrofurane sec (1 mL) a été ajoutée de l'hydrure de sodium (suspension à 60% dans l'huile, 45 mg, 1,1 mmol) et la suspension a été agitée à 50°C pendant 1h. Une solution de 8-Chloro-8-oxooctanoate de 5-

chloro-2-(2,4-dichlorophénoxy)phényle **10** (0,102g, 0,22 mmol) dans le tétrahydrofurane sec a été ajoutée goutte à goutte et le mélange a été agité à température ambiante pendant la nuit. De l'eau (60 mL) a ensuite été ajoutée au milieu réactionnel et celui-ci a été extrait avec de l'acétate d'éthyle (2 x 60 mL). La phase organique a été lavée avec de la saumure (80 mL), séchée avec du sulfate de magnésium anhydre et le solvant en excès a été évaporé sous vide. Le brut obtenu a été purifié par colonne chromatographique sur gel de silice (cyclohexane/acétate d'éthyle, de 100/0 à 95/5) permettant d'obtenir le 3,5-Dichloro-2,6-diméthylpyridin-4-yl octanedioate de 5-chloro-2-(2,4-dichlorophénoxy)phényl **IV** sous la forme d'une huile blanche (95 mL, 68% de rendement). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7,45 (d, ⁴J = 4 Hz, 1H), 7,21-7,14 (m, 3H), 6,86 (d, ³J = 8 Hz, 1H), 6,84 (d, ³J = 8 Hz, 1H), 2,65 (t, ³J = 8 Hz, 2H), 2,60 (s, 6H), 2,50 (t, ³J = 8 Hz, 2H), 1,78 (p, ³J = 8 Hz, 2H), 1,68 (p, ³J = 8 Hz, 2H), 1,50-1,37 (m, 4H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 171,1 (Cq), 169,1 (Cq), 154,9 (3 Cq), 151,2 (Cq), 146,7 (Cq), 142,02 (Cq), 130,5 (CH), 129,6 (Cq), 129,5 (Cq), 128,3 (CH), 127,1 (CH), 125,9 (Cq), 124,6 (CH), 123,1 (2 Cq), 120,4 (CH), 120,3 (CH), 33,9 (CH₂), 33,7 (CH₂), 28,7 (CH₂), 28,6 (CH₂), 24,7 (CH₂), 24,6 (CH₂), 22,6 (2 CH₃). IR ν 2936, 1770, 1542, 1472, 1399, 1264, 1078, 809, 753, 560. HRMS (DCI/CH₄) m/z calculée pour C₂₇H₂₄Cl₅NO₅ (M⁺) 617.0097, trouvée 617.0111.

10.2.15 **3-Chloro-2,6-diméthyl-5-{4-[4-(trifluorométhoxy)phénoxy]phényl}pyridin-4-yl octanedioate de 5-chloro-2-(2,4-dichlorophénoxy)phényle V**

A une solution de 3-Chloro-2,6-diméthyl-5-{4-[4-(trifluorométhoxy)phénoxy]phényl}pyridin-4(1*H*)-one **I** (40 mg, 0,098 mmol) dans le tétrahydrofurane sec (1 mL) a été ajoutée de l'hydrure de sodium (suspension à 60% dans l'huile, 78 mg, 0,19 mmol) et la suspension a été agitée à température ambiante pendant 10 min. une solution de 8-Chloro-8-oxooctanoate de 5-chloro-2-(2,4-dichlorophénoxy)phényle **10** (45 mg, 0,098 mmol) dans le tétrahydrofurane sec (0,7 mL) a été ajoutée goutte à goutte et le mélange a été agité à température ambiante durant la nuit. De l'eau (20 mL) a ensuite été ajoutée au milieu réactionnel et celui-c a été extrait avec de l'acétate d'éthyle (2x 20 mL). La phase organique a été lavée avec de la saumure (50 mL), séchée avec du sulfate de magnésium anhydre et le solvant en excès a été évaporé sous vide. Le brut obtenu a été purifié par colonne chromatographique sur gel de silice (cyclohexane/acétate d'éthyle, de 100/0 à 90/10) permettant d'obtenir le 3-Chloro-2,6-diméthyl-5-{4-[4-(trifluorométhoxy)phénoxy]phényl}pyridin-4-yl octanedioate de 5-chloro-2-(2,4-dichlorophénoxy)phényle **V** sous la forme d'une huile transparente (25 mg, 30% de rendement). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7,42 (d, ⁴J = 2 Hz, 1H), 7,23-7,12 (m, 7H), 7,07-7,00 (m, 4H), 6,86-6,80 (m, 2H), 2,67 (s, 3H), 2,46 (t, ³J = 8 Hz, 2H), 2,34 (s, 3H), 2,28 (t, ³J = 8 Hz, 2H),

1,61 (p, $^3J = 8$ Hz, 2H), 1,45 (p, $^3J = 8$ Hz, 2H), 1,33-1,14 (m, 4H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 171,1 (Cq), 170,0 (Cq), 157,0 (Cq), 156,2 (Cq), 155,8 (Cq), 155,3 (Cq), 152,2 (Cq), 151,2 (Cq), 146,7 (Cq), 145,0 (Cq), 142,0 (Cq), 131,1 (2 CH), 130,5 (CH), 129,6 (Cq), 129,5 (Cq), 129,5 (Cq), 129,1 (Cq), 128,3 (CH), 127,1 (CH), 125,9 (Cq), 124,6 (CH), 122,9 (2 CH), 122,2 (Cq), 120,6 (q, $^1J = 255$ Hz, Cq), 120,4 (CH), 120,3 (CH), 120,2 (2 CH), 118,8 (2 CH), 33,8 (CH_2), 33,7 (CH_2), 28,6 (2 CH_2), 24,6 (CH_2), 24,4 (CH_2), 23,2 (CH_3), 22,9 (CH_3). ^{19}F NMR (CDCl_3 , 376 MHz) δ -58,23 (s). IR ν 3194, 2934, 2852, 1653, 1597, 1547, 1498, 1443, 1315, 757, 690, 605, 506. HRMS (DCI/ CH_4) m/z calculée pour $\text{C}_{40}\text{H}_{32}\text{Cl}_4\text{F}_3\text{NO}_7$ (M^+) 835,0885, trouvée 835,0898 ; pour $\text{C}_{40}\text{H}_{33}\text{Cl}_4\text{F}_3\text{NO}_7$ ($\text{M}+\text{H}^+$) 836,0963, trouvée 836,0937 ; pour $\text{C}_{42}\text{H}_{37}\text{Cl}_4\text{F}_3\text{NO}_7$ ($\text{M}+\text{C}_2\text{H}_5^+$) 864,1276, trouvée 864,1277.

10.2.16 **8-[(8-anilino-8-oxooctanoyl)amino]oxy}-8-oxooctanoate de benzyle 11**

A une solution d'acide 8-(benzyloxy)-8-oxooctanoïque **7** (0,4 g, 1,51 mmol), d'hydrate de 1-hydroxybenzotriazole (HOBt, 0,225 g, 1,67 mmol et de chlorhydrate de 1-ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC, 0,319 g, 1,67 mmol) dans du *N,N*-diméthylformamide sec (2 mL) a été ajoutée du *N*¹-Hydroxy-*N*⁸-phenyloctanediamide **II** (0,4 g, 1,51 mmol) dissous dans du *N,N*-diméthylformamide sec (1 mL) et la solution obtenue a été agitée à température ambiante sous atmosphère d'argon pendant 1 jour. Le solvant en excès a été évaporé sous vide. Le brut obtenu a été dissous dans le dichlorométhane (10 mL) et lavé avec de l'eau (10 mL). La phase organique a ensuite été séchée avec du sulfate de magnésium anhydre et le solvant en excès a été évaporé sous vide permettant d'obtenir le 8-[(8-anilino-8-oxooctanoyl)amino]oxy}-8-oxooctanoate de benzyle **11** sous la forme d'un solide blanc (0,063 g, 33% de rendement). ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ 9,39 (br s, 1H), 7,62 (s, 1H), 7,51 (d, $^3J = 8$ Hz, 2H), 7,40-7,26 (m, 7H), 7,08 (t, $^3J = 8$ Hz, 1H), 5,11 (s, 2H), 2,43 (t, $^3J = 7$ Hz, 2H), 2,38-2,30 (m, 4H), 2,24 (t, $^3J = 7$ Hz, 2H), 1,80-1,55 (m, 8H), 1,46-1,29 (m, 8H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ 176,7 (Cq), 173,7 (Cq), 172,0 (Cq), 171,9 (Cq), 138,2 (Cq), 136,2 (Cq), 129,1 (2 CH), 128,7 (2 CH), 128,3 (CH), 128,3 (2 CH), 124,3 (CH), 120,0 (2 CH), 66,3 (CH_2), 37,3 (CH_2), 34,3 (CH_2), 32,7 (CH_2), 31,7 (CH_2), 28,7 (CH_2), 28,7 (CH_2), 28,3 (CH_2), 28,2 (CH_2), 25,3 (CH_2), 24,8 (CH_2), 24,8 (CH_2), 24,5 (CH_2). IR ν 2933, 2859, 1768, 1498, 1473, 1239, 1187, 1100, 858, 837, 809, 515. LR-MS (DCI/ NH_3) $m/z = 511,3$ ($\text{M}+\text{H}^+$), 528,4 ($\text{M}+\text{NH}_4^+$).

10.2.17 **2-[2-(Triphénylméthoxy)éthoxy]éthan-1-ol 12**

A du diéthylène glycol (4,5 mL, 37,9 mmol) a été ajouté de la pyridine (0,4 mL, 4,9 mmol) et du chlorure de trityle (0,525 g, 1,88 mmol) et le mélange a été agité à 55°C pendant

3h. De l'eau (30 mL) a été ajoutée et le mélange a été extrait avec du toluène (60 mL). La phase organique a été lavée avec une solution d'acide chlorhydrique à 0,3M (30 mL), une solution saturée de bicarbonate de sodium (30 mL), de l'eau (30 mL) et séchée avec du sulfate de magnésium anhydre. Le solvant en excès a été évaporé sous vide permettant d'obtenir le 2-[2-(Triphénylméthoxy)éthoxy]éthan-1-ol **12** sous la forme d'un solide blanc (0,56 g, 85% de rendement) utilisé sans purification supplémentaire. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 7,52-7,44 (m, 6H), 7,36-7,13 (m, 9H), 3,80-3,72 (m, 2H), 3,71 (t, ³J = 5 Hz, 2H), 3,65 (t, ³J = 5 Hz, 2H), 3,28 (t, ⁴J = 5 Hz, 2H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 144,2 (3 Cq), 128,9 (6 CH), 127,9 (6 CH), 127,1 (3 CH), 86,8 (Cq), 72,4 (CH₂), 70,8 (CH₂), 63,5 (CH₂), 62,0 (CH₂). HR-MS (DCI/CH₄) m/z calculée pour C₂₃H₂₄O₃ (M⁺) 348.1725, trouvée 348.1731.

10.2.18 Carbonate de 5-Chloro-2-(2,4-dichlorophénoxy)phényl 2-[2-(triphénylméthoxy)éthoxy]éthyle **13**

A une solution de 2-[2-(Triphénylméthoxy)éthoxy]éthan-1-ol **12** (0,4 g, 1,15 mmol) dans l'acétonitrile sec (10 mL) a été ajoutée du carbonate de *N,N'*-disuccinimidyle (0,588 g, 2,30 mmol) et la suspension a été agitée à 0°C. De la triéthylamine (0,5 mL, 3,44 mmol) a été ajoutée goutte à goutte et le mélange a été agité pendant 1h à 0°C et pendant 2h à température ambiante. Le solvant en excès a été évaporé sous vide, le brut obtenu a été dissous dans l'acétate d'éthyle (100 mL) et la solution a été lavée avec une solution saturée de bicarbonate de sodium (50 mL). La phase aqueuse a été extraite avec de l'acétate d'éthyle (50 mL). Les phases organiques combinées ont été séchées avec du sulfate de magnésium anhydre et le solvant en excès a été évaporé sous vide. Le brut obtenu a été dissous dans l'acétonitrile sec (20 mL). A cette solution a été ajoutée du triclosan (0,4 g, 1,38 mmol) et de la 4-(diméthylamino)pyridine (0,337 g, 2,76 mmol) et le mélange a été agité à température ambiante durant la nuit. Le solvant en excès a été évaporé sous vide et le brut obtenu a été dissous dans l'acétate d'éthyle (100 mL). La solution a été lavée avec une solution saturée de bicarbonate de sodium (50 mL) et de la saumure (70 mL). La solution a été séchée avec du sulfate de magnésium anhydre et le solvant en excès a été évaporé sous vide. Le brut obtenu a été purifié par colonne chromatographique sur gel de silice (100% toluène) permettant d'obtenir le carbonate de 5-Chloro-2-(2,4-dichlorophénoxy)phényl 2-[2-(triphénylméthoxy)éthoxy]éthyle **13** sous la forme d'un solide blanc (0,264 g, 35% de rendement). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 7,49-7,43 (m, 6H), 7,41 (d, ⁴J = 3 Hz, 1H), 7,34-7,17 (m, 10H), 7,24-7,16 (m, 2H), 6,87 (d, ³J = 8 Hz, 1H), 6,76 (d, ³J = 8 Hz, 1H), 4,43-4,36 (m, 2H), 3,83-3,76 (m, 2H), 3,67 (t, ³J = 5 Hz, 2H), 3,23 (t, ³J = 5 Hz, 2H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 152,7 (Cq), 150,7 (Cq), 147,0 (Cq), 144,0 (3 Cq), 141,7 (Cq), 130,5 (CH), 129,9 (Cq), 129,0 (Cq), 128,8 (6 CH), 128,2 (CH), 127,8 (6 CH), 127,3 (CH), 127,0 (3 CH), 126,4 (Cq), 124,0 (CH), 121,0 (CH), 119,7 (CH), 86,6 (Cq), 70,8 (CH₂), 68,7

(CH₂), 68,5 (CH₂), 63,4 (CH₂). HR-MS (ES⁺) m/z calculée pour C₃₆H₂₉Cl₃O₆Na (M+Na⁺) 685.0927, trouvée 685.0937.

10.2.19 **Carbonate de 5-chloro-2-(2,4-dichlorophénoxy)phényl 2-(2-hydroxyéthoxy)éthyle 14**

A une solution de Carbonate de 5-Chloro-2-(2,4-dichlorophénoxy)phényl 2-[2-(triphénylméthoxy)éthoxy]éthyle **13** (0,374 g, 0,56 mmol) dans du dichlorométhane (20 mL) a été ajoutée du triisopropylsilane (98 mg, 0,62 mmol) et une solution d'acide trifluoroacétique à 10% dans le dichlorométhane (4 mL) et le mélange a été agité à température ambiante pendant 30 min. Le solvant en excès a été évaporé sous vide et le brut obtenu a été purifié par colonne chromatographique sur gel de silice (cyclohexane/acétate d'éthyle, de 90/10 à 50/50) permettant d'obtenir le carbonate de 5-chloro-2-(2,4-dichlorophénoxy)phényl 2-(2-hydroxyéthoxy)éthyle **14** sous la forme d'une huile transparente (0,172 g, 72% de rendement). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 7,46 (d, ⁴J = 2 Hz, 1H), 7,29 (d, ⁴J = 2 Hz, 1H), 7,22-7,14 (m, 2H), 6,91 (d, ³J = 9 Hz, 1H), 6,80 (d, ³J = 9 Hz, 1H), 4,42-4,35 (m, 2H), 3,81-3,69 (m, 4H), 3,64-3,56 (m, 2H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 152,6 (Cq), 150,7 (Cq), 146,9 (Cq), 141,7 (Cq), 130,5 (CH), 129,9 (Cq), 129,1 (Cq), 128,2 (CH), 127,4 (CH), 126,3 (Cq), 123,9 (CH), 120,9 (CH), 119,7 (CH), 72,5 (CH₂), 68,6 (CH₂), 68,2 (CH₂), 61,8 (CH₂). HR-MS (DCI/CH₄) m/z calculée pour C₁₇H₁₆Cl₃O₆ (M+H⁺) 421.0012, trouvée 421.0012.

11 Bibliographie complémentaire

Université médicale virtuelle francophone. (Page consultée le 26/09/18). Paludisme, [en ligne]. <http://campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/paludisme/site/html/3.html>

Centers for disease control and prevention. (Page consultée le 02/10/18). Insecticide Treated Bed Nets, [en ligne].

https://www.cdc.gov/malaria/malaria_worldwide/reduction/itn.html

Malaria consortium. (Page consultée le 02/10/18). Long Lasting Insecticidal Nets, [en ligne]. <https://www.malariaconsortium.org/pages/110.htm>

Malaria vaccine initiative. (Page consultée le 04/10/18). Vaccine development, [en ligne]. <https://www.malariavaccine.org/malaria-and-vaccines/vaccine-development> 04/10/18

Malaria vaccine initiative. (Page consultée le 04/10/18). RTS,S, [en ligne]. <https://www.malariavaccine.org/malaria-and-vaccines/first-generation-vaccine/rtss>

Le Monde. (Page consultée le 04/10/18) Paludisme, la guerre d'usure (série de 10 articles), [en ligne].

https://www.lemonde.fr/recherche/?keywords=Paludisme++la+guerre+d%E2%80%99usure&page_num=1&operator=and&exclude_keywords=&qt=recherche_texte_titre&author=&period=for_1_year&start_day=01&start_month=01&start_year=1944&end_day=05&end_month=11&end_year=2018&sort=desc

Organisation Mondiale de la Santé. (Page consultée le 06/10/18). Guidelines for the treatment of Malaria, [pdf en ligne].

http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/162441/9789241549127_eng.pdf;jsessionid=0263795EA9BD6F925B6134648C05290E?sequence=1

Centre National de la Recherche Scientifique. (Page consultée le 06/10/18). Histoire de la quinine dans la lutte contre le paludisme, [en ligne].

http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/dosbiodiv/index.php?pid=decouv_chapC_p3_c&zoom_id=zoom_c1_4&savoir_id=savoir_c1_z4_1

Vidal. (Page consultée le 06/10/18). Page d'accueil Vidal.fr, [en ligne]. <https://www.vidal.fr/>

Medecines for Malaria Venture. (Page consultée le 11/10/18). MMV-supported projects, [en ligne]. <https://www.mmv.org/research-development/mmv-supported-projects>

PubChem. (Page consultee le 11/10/18). Explore Chemistry-Quickly find chemical information from authoritative sources, [en ligne]. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/search/>

Drugbank. (Page consultee le 11/10/18). Drugbank database, [en ligne]. <https://www.drugbank.ca/>

Paloque L, Ramadani AP, Mercereau-Puijalon O, Augereau J-M, Benoit-Vical F. Plasmodium falciparum: multifaceted resistance to artemisinins. Malar J. 2016;15(1).

Ouji M, Augereau J-M, Paloque L, Benoit-Vical F. Plasmodium falciparum resistance to artemisinin-based combination therapies: A sword of Damocles in the path toward malaria elimination. Parasite. 2018;25:24.

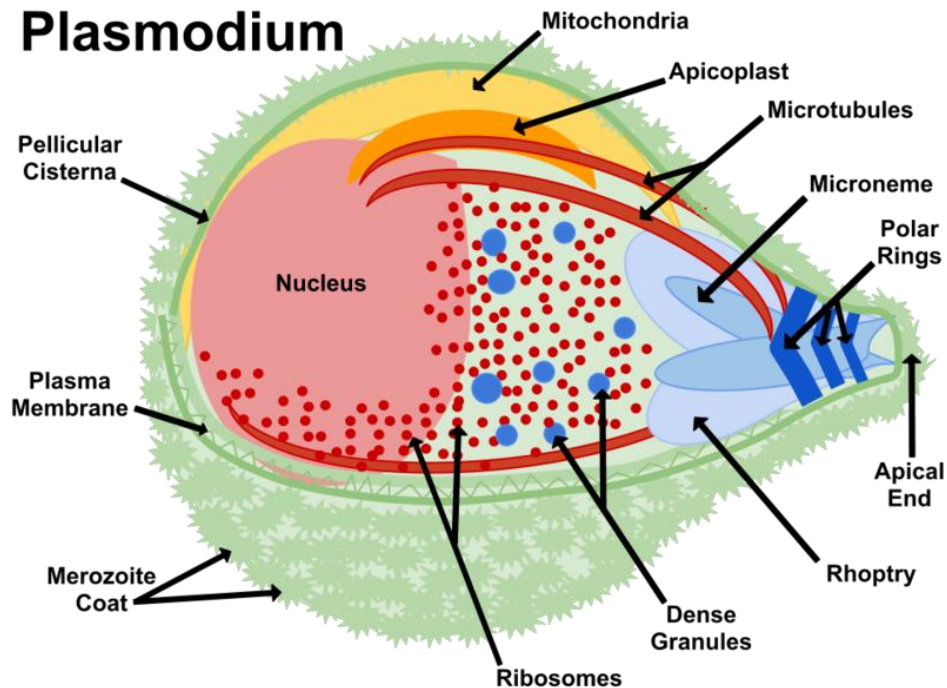
Cabrera DG, Horatscheck A, Wilson CR, Basarab G, Eyermann CJ, Chibale K. Plasmodial Kinase Inhibitors: License to Cure? Journal of Medicinal Chemistry. 27 sept 2018;61(18):8061-77.

Agarwal D, Gupta RD, Awasthi SK. Are Antimalarial Hybrid Molecules a Close Reality or a Distant Dream? Antimicrobial Agents and Chemotherapy. mai 2017;61(5):e00249-17.

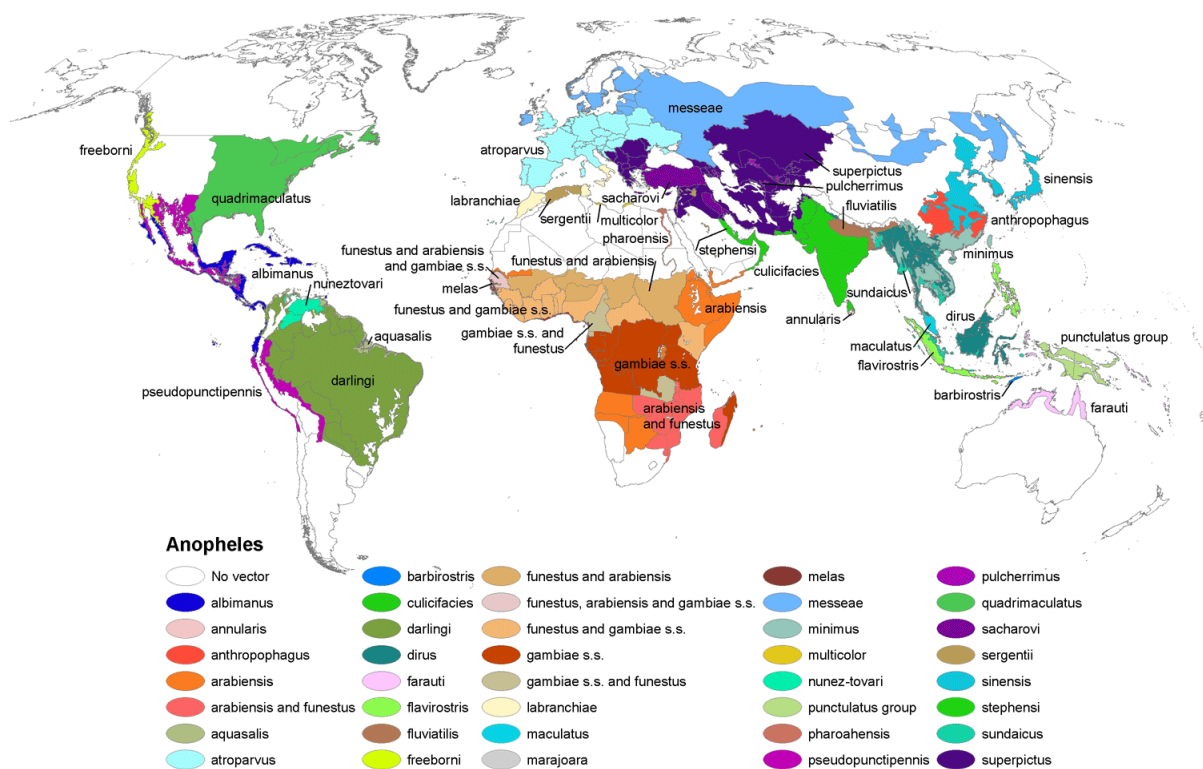
Decker M. Antiplasmodials Hybrids Coumpounds. Dans : Decker M, éditeur. Design of hybrids molecules for drug development. Elsevier;2017.

12 Annexes

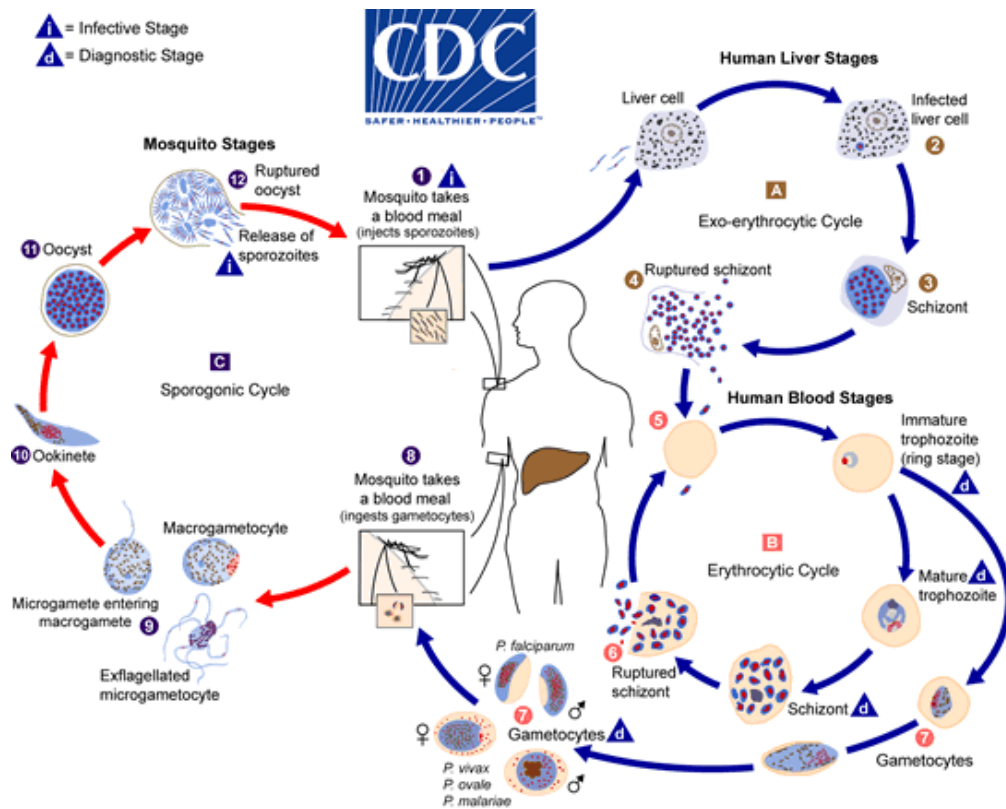
Annexe 1 : Schéma décrivant les différentes parties d'un *Plasmodium* au stade mérozoïte (Source : <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Plasmodium.png> par Jfbranch14).



Annexe 2 : Répartition sur le globe des différentes espèces d'*Anopheles* (Source : <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/mosquitoes/map.html>)



<https://www.cdc.gov/dpdx/malaria/index.html>)

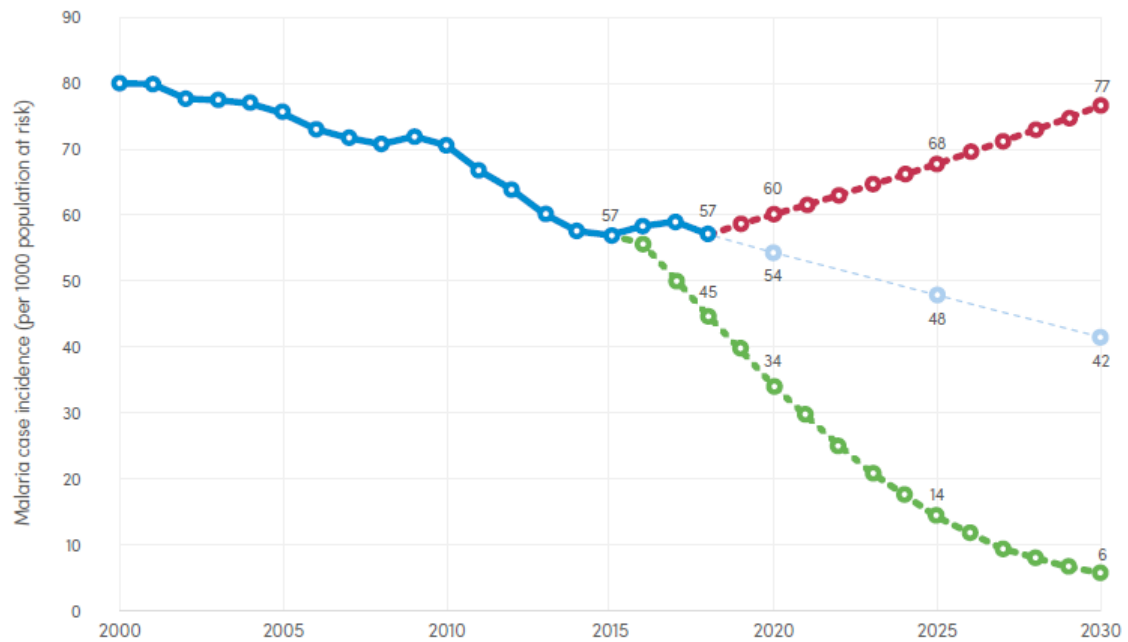


Annexe 4 : Tableau résumant les facteurs génétiques et environnementaux pouvant modifier directement ou indirectement la relation *Plasmodium*-Anophèle. (Source : Tripet F, Aboagye-Antwi F, Hurd H. Ecological immunology of mosquito–malaria interactions. Trends Parasitol. 2008;24(5):219-27.)

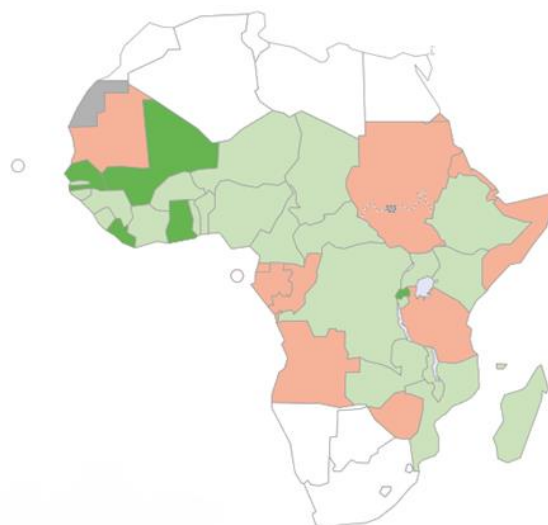
Factors	Possible mechanisms	Expected effect	Refs ^a
Mosquito genetic factors			
Genetic determinants of susceptibility and resistance	Immune surveillance molecules (PRRs) immune effector molecules	Parasite survival and development	[34]
Genetic determinants of adult body quality	Adult size and longevity	Parasite development	
Mosquito environmental factors			
Larval environment	Temperature, habitat quality, food, larval density	Adult quality, adult longevity, adult immune system, resistance to malaria	[46,63]
Adult environment during infection	Dietary components, temperature, humidity, adult density	Mosquito immune response, survival, parasite development	[1,43,45,47,64]
Interaction between genetic and environmental factors			
Interactions with larval environment	Food, temperature, habitat quality, larval density	Adult quality, resistance to malaria	[1]
Interactions with adult environment during infection	Sugar feeding, temperature, humidity	Resistance to malaria and vector fitness	[49,50]
Plasmodium genetic factors			
Genetic determinants of susceptibility and resistance	Virulence genes, ligands for surveillance molecules (PAMPs), ability to suppress host immune response	Vector survival and fecundity and mosquito immune response	[44,65,66]
Plasmodium environmental factors			
Mosquito genetic and environmental factors	See mosquito environmental factors within this table and associated references	Parasite survival and development	[1,43,45-47,63,64]
Environmental factors independent of the vector	Temperature and parasite density	Parasite survival and development	[67]
Interaction between genetic and environmental factors			
Interactions between <i>Plasmodium</i> , mosquito and environmental factors	<i>Plasmodium</i> virulence and sugar feeding	Parasite survival and development	[44]

^aWhere possible, references have been selected to support the concept that genetic and environmental factors will affect infection. Abbreviations: PAMPs, pathogen-associated molecular pattern; PRRs, host pattern recognition receptor.

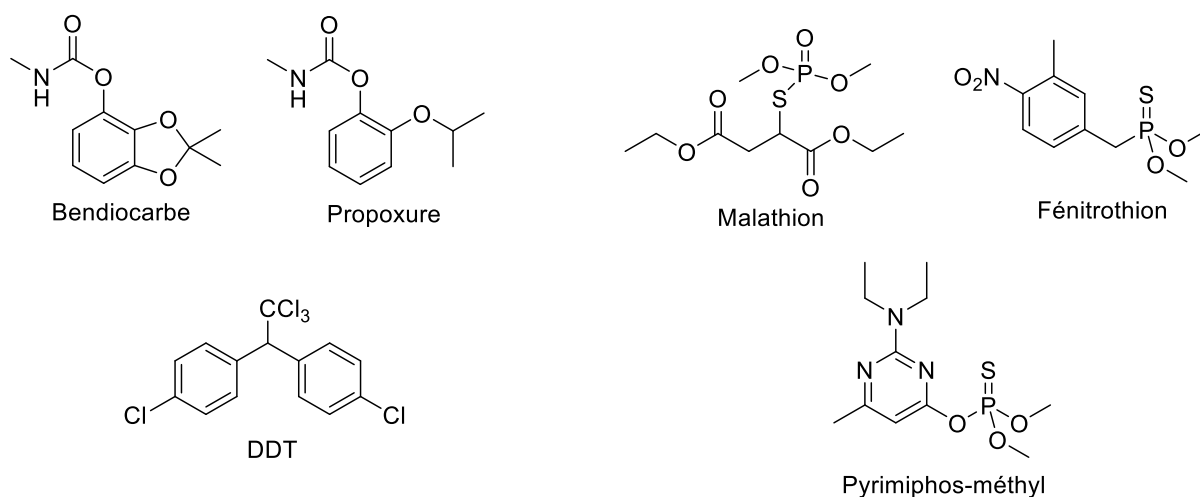
Annexe 5 : Evolution du taux d'incidence du paludisme au cours du temps selon trois scénarios différents (pour 1000 personnes à risque). Légende : courbe bleue : Estimations actuelles du taux d'incidence ; courbe verte : objectifs de la stratégie mondiale de lutte contre le paludisme 2016-2030⁵ ; courbe bleu ciel : tendance prévue si la tendance actuelle se poursuit ; courbe rouge : retour à l'incidence des années précédentes (pire scénario). (Source : OMS⁴)



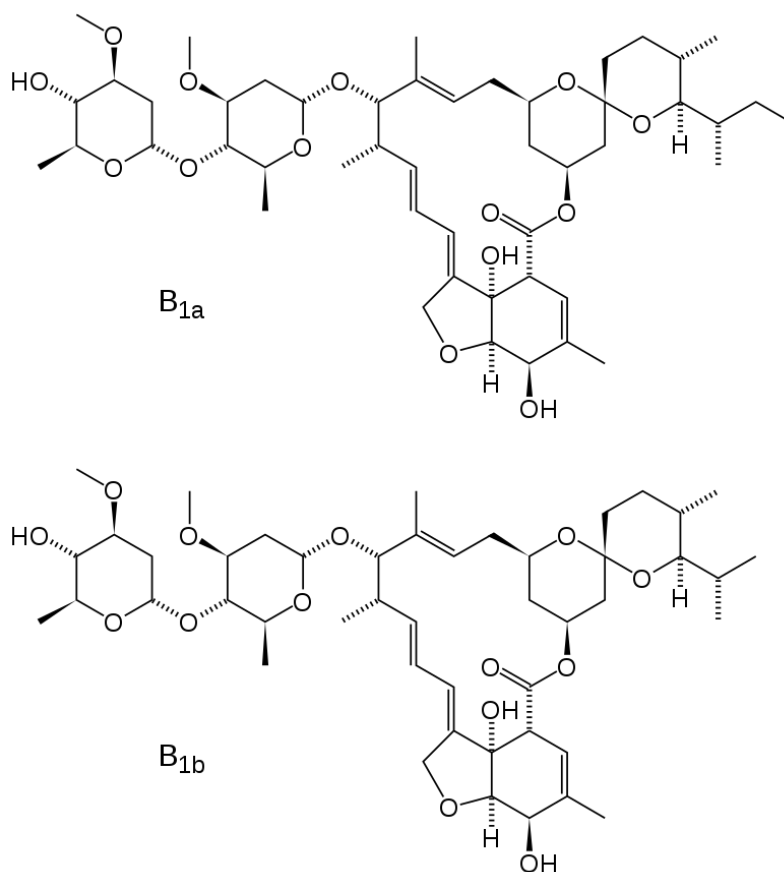
Annexe 6 : Proportion de la population à risque, par pays, pouvant accéder à une moustiquaire imprégnée d'insecticide. Légende : en vert, supérieure ou égale à 80% ; en vert pâle, entre 50% et 80% ; en rose, moins de 50% ; en blanc, pas de paludisme endémique ; en gris, non applicable. (Source : OMS⁴)



Annexe 7 : Structures chimiques des différents insecticides (hors pyréthroides) utilisés dans la pulvérisation résiduelle intérieure.



Annexe 8 : Structures chimiques de la 22,23-dihydroavermectine B_{1a} et de la 22,23-dihydroavermectine B_{1b}, molécules englobées sous le nom d'ivermectine.

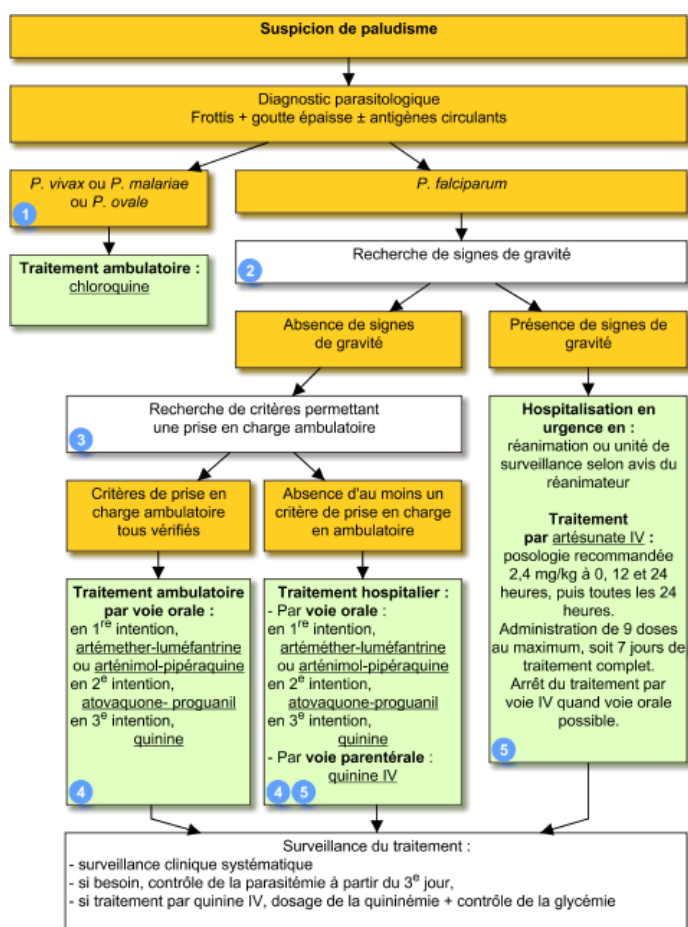


Annexe 9 : Tableau résumant l'avancée et la cible des différents vaccins antipaludiques en cours de développement (D'après Coelho *et al.*¹⁶)

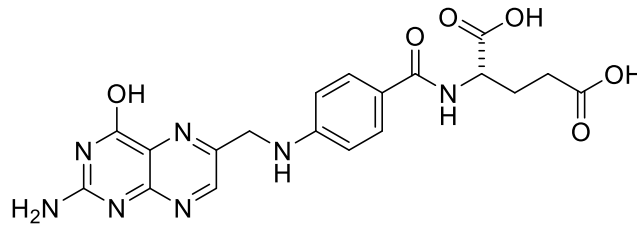
Parasite stage	Vaccine classification	Current status
Pre-erythrocytic stage		
PfSPZ vaccine	Whole organism (radiation attenuation)	Phase II
GAP vaccines	Whole organism (genetic attenuation)	Phase I
RTS,S	Subunit	Phase IV
CVac	Whole organism (chemical attenuation)	Phase I
Blood stage		
Chemically attenuated parasites	Whole organism	Preclinical
AMA1-RON2	Subunit	Preclinical
PfRH5	Subunit	Phase I
Mosquito stage (TBVs)		
Pfs25	Subunit	Phase I
Pfs230	Subunit	Phase I
Pfs47	Subunit	Preclinical

Pre-erythrocytic, blood-stage and transmission-blocking vaccines are being evaluated in clinical trials (denoted as phases I to IV) or are being tested in rodent or non-human primate models (preclinical status).

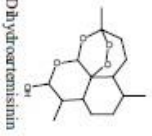

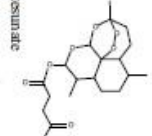
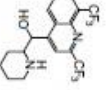
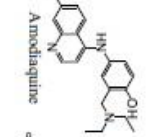
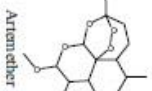
Annexe 10 : Arbre décisionnel de la prise en charge du paludisme en France. (Source : https://www.vidal.fr/recommandations/1845/paludisme_traitement/prise_en_charge/)



Annexe 11 : Structure chimique de l'acide folique.



Annexe 12 : Tableau récapitulatif des ACTs disponibles sur le marché (Source : M. Uji et al.: Parasite 2018, 25, 24)

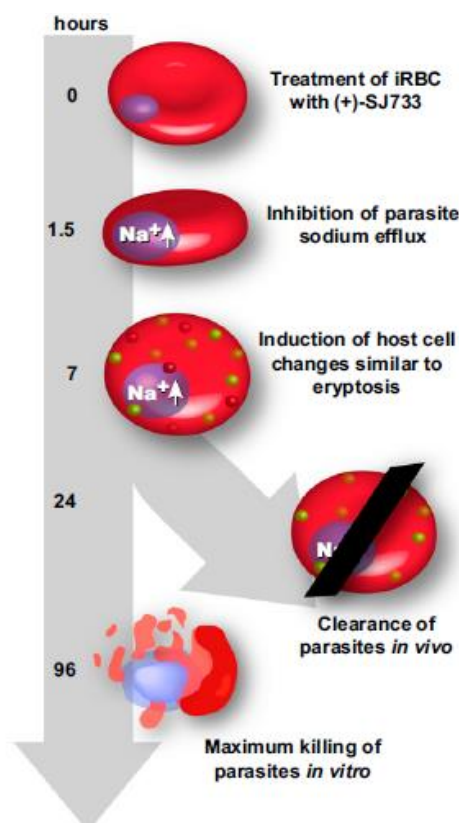
ACTs	Dihydroartemisinin - piperazine	Artesunate-pyronaridine	Artesunate-sulfadoxine-pyrimethamine	Artesunate-mefloquine	Artesunate-amodiaquine	Artemether-lumefantrine
Brand name (suppliers)	Eunartesin® (Sigma-Tau) Arckind® (Hollekylin) Diphos® (Genix Pharma)	Pyramax® Shin Poong Pharmaceutical Co. Ltd.	Artesunate + Sulfadoxine + Pyrimethamine Tablets (Advocate PHARMA) Malosunate® (Auhui)	ASIM FDC (DNIDI/Cipla Ltd)	ASAQ Winthrop® (Sanofi)	Coartem® Rianet® (Novartis)
Partner drug	 Dihydroartemisinin	 Pyronaridine	 Artesunate	 Mefloquine	 Amodiaquine	 Artemether
Target of the partner drug	Hemozoin synthesis	Hemozoin synthesis	DHPS - DHFR	Hemozoin synthesis	Hemozoin synthesis	Hemozoin synthesis
Resistance mechanism of the partner drug	<i>Plasmeprin 2-3</i> amplification [4, 83]	Not identified	Modification of the drug target [28]	Amplification of <i>Pfmdr1</i> copy number [64]	<i>Pfcr1</i> and <i>Pfmdr1</i> mutations [25]	Amplification of <i>Pfmdr1</i> copy number [65]

DHPS = dihydropyrimidine synthase
DHFR = dihydrofolate reductase

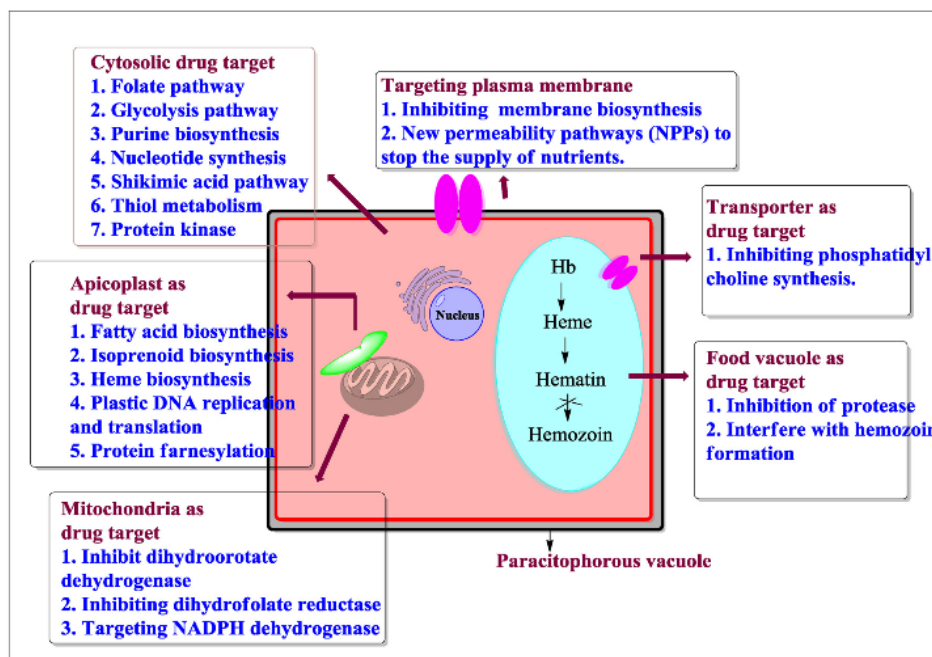
Annexe 13 : Résumé des différentes activités antipaludiques pour 4 composés au stade II des essais cliniques. (D'après Ashton *et al.*³⁹)

compd	KAE609	KAF156	DSM265	MMV048
protein target activity IC ₅₀ (nM)	12 (PfATP4 Na ⁺ homeostasis assay)	n/a	33 (PfDHODH)	3.4 (PvPI4K)
asexual blood stage (72 h) EC ₅₀ (nM)	0.9 (NF54)	10 (3D7)	7.8 (3D7)	28 (NF54)
Pf ABS PRR	kills early and late trophozoites and schizonts, moderate acting in vitro, very fast acting in vivo	fast acting	kills at early trophozoite stage, slow acting	moderate rate of kill
gametocytes—early	EC ₉₉ 50 nM	not active	not active	EC ₅₀ 214 nM
gametocytes—late	EC ₉₉ 500 nM	EC ₅₀ 4 nM	not active	EC ₅₀ 140 nM
dual gamete formation assay, male EC ₅₀ (nM)	not active	no data	not active	90
dual gamete formation assay, female EC ₅₀ (nM)	not active	no data	not active	not active
SMFA	EC ₉₉ 500 nM	EC ₉₉ 500 nM	not active	EC ₅₀ 111 nM
liver, schizont EC ₅₀ (nM)	not active	10 (Pb)	5.7 (Pf)	64 (Pc)
liver, hypnozoite EC ₅₀ (nM)	not active	not active	not active	not active
Pb mouse efficacy	ED ₉₉ 5.3 mg/kg	ED ₉₉ 2.2 mg/kg	no data	cure at a single 100 mg/kg oral dose
Pf mouse SCID efficacy	no data	no data	ED ₉₀ 3 mg/kg (qd) and 1.5 mg/kg (b.i.d.)	ED ₉₀ 1.1 mg/kg

Annexe 14 : Effets sur une hématie infectée par *Plasmodium* d'un traitement inhibiteur de PfATP4 (ici SJ733). *In vitro*, le développement du parasite est stoppé après 24h et une mort lente s'engage avec un maximum atteint à 96h. *In vivo*, les hématies dont l'éryptose est initiée vont être phagocytées par le système immunitaire de l'hôte. (D'après Jiménez-Díaz MB, Ebert D, Salinas Y, Pradhan A, Lehane AM, Myrand-Lapierre M-E, et al. (+)-SJ733, a clinical candidate for malaria that acts through ATP4 to induce rapid host-mediated clearance of *Plasmodium*. P Natl Acad Sci USA. 2014;111(50):E5455-62.)



Annexe 15 : Exemples de cibles parasitaires pouvant être ciblé par des médicaments.
 (Source : Kumar S, Bhardwaj TR, Prasad DN, Singh RK. Drug targets for resistant malaria: Historic to future perspectives. Biomed Pharmacother. 2018;104:8-27)

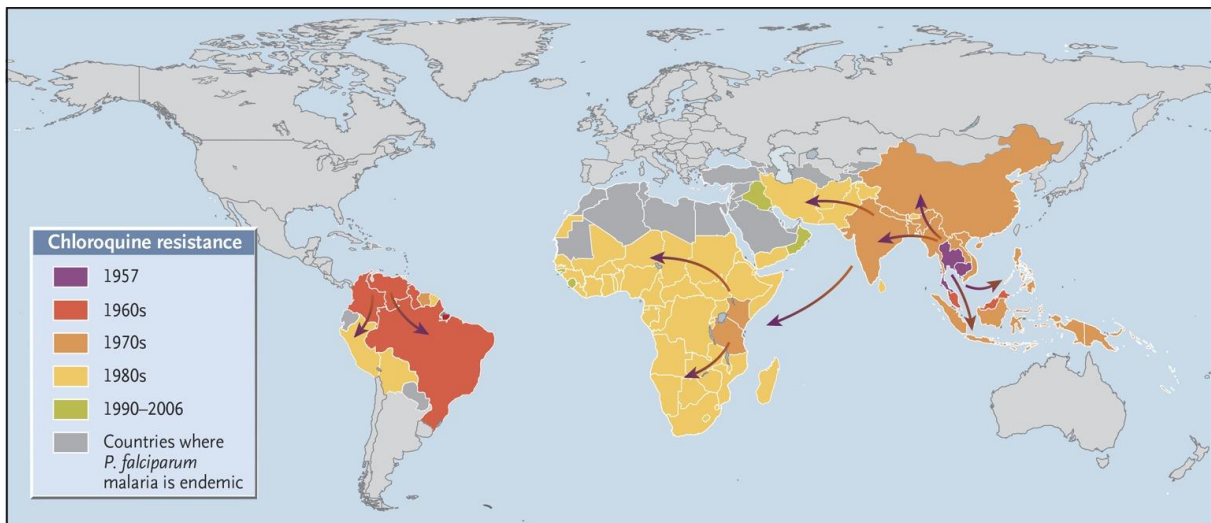


Annexe 16 : Tableau récapitulatif des gènes responsables des résistances aux différents antipaludiques. (Source : Haldar K, Bhattacharjee S, Safeukui I. Drug resistance in Plasmodium. Nat Rev Microbiol. 2018;16(3):156-70)

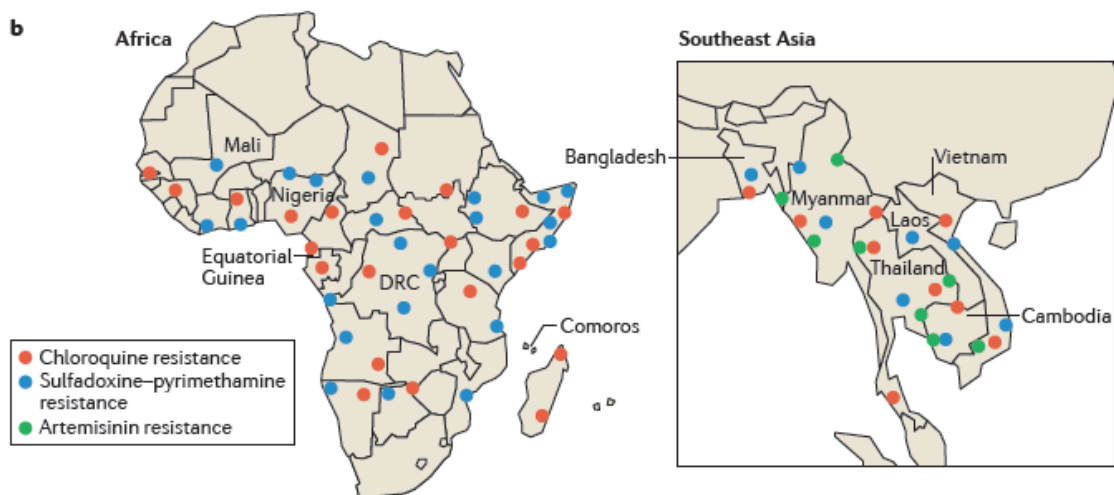
Chemical class	Common name	Targeted parasite stage	Genetic marker for drug resistance	
			<i>Plasmodium falciparum</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
Sesquiterpene lactone endoperoxides	Artemisinin*	All parasite stages	<i>pfkelch13</i> (REF. 18)	Unknown
	Artesunate* ¹	All parasite stages	<i>pfkelch13</i> (REF. 18)	Unknown
	Artemether* ¹	All parasite stages	<i>pfkelch13</i> (REF. 18)	Unknown
	Dihydroartemisinin* ¹	All parasite stages	<i>pfkelch13</i> (REF. 18)	Unknown
4-Aminoquinolines	Chloroquine ¹⁵	Blood stages (trophozoite and schizont)	<i>pfcr1</i> ^{17,16}	<i>pvmr1</i> (REF. 81)
	Amodiaquine* ¹	Blood stages (trophozoite and schizont)	<i>pfcr1, pfmdr1</i> (REF. 129)	Unknown
	Piperaquine* ¹	Blood stages (trophozoite and schizont)	<i>pfplm2</i> (REFS 37,38), <i>pfcr1</i> ^{45,130}	Unknown
	Pyronaridine	Blood stages (ring, trophozoite and schizont)	<i>pfcr1</i> ³¹	Unknown
	Naphthoquine*	Blood stages (trophozoite and schizont)	Unknown	Unknown
Amino alcohols	Quinine ⁵	Blood stages (trophozoite and stages I to III gametocytes)	<i>pfcr1, pfmdr1</i> (REFS 51, 132)	Unknown
	Mefloquine*	Blood stages (trophozoite and schizont)	<i>pfmdr1</i> (REFS 133-135)	<i>pvmr1</i> (REFS 81,82)
	Lumefantrine* ¹	Blood stages (trophozoite and schizont)	<i>pfcr1, pfmdr1</i> (REFS 132, 136)	Unknown
	Halofantrine ⁵	Blood stages (trophozoite and schizont)	<i>pfcr1, pfmdr1</i> (REF. 135)	Unknown
8-Aminoquinoline	Primaquine* ¹	Blood (gametocyte) and liver (schizont) forms	Unknown	Unknown
Antifolates	Pyrimethamine*	Blood and liver schizont and mosquito stage (oocysts)	<i>pfdhfr</i> ¹³⁷	<i>pvdhfr</i> ⁸³
	Sulfadoxine*	Blood and liver schizont	<i>pfdhps</i> ¹³⁷	<i>pvdhps</i> ^{83,138}
	Proguanil*	Blood stages (schizont and gametocyte) and liver schizont	<i>pfdhfr</i> ¹³⁹	Unknown
Naphthoquinone	Atovaquone ⁵	Blood stages (schizont and gametocyte) and liver schizont	<i>pfcytb</i> ¹⁴⁰	Unknown
Antibiotics	Clindamycin ⁵	Blood stages	Apicoplast target ⁵⁷	Unknown
	Doxycycline ⁵	Blood stages	Apicoplast target ⁵⁷	Unknown
	Tetracycline ⁵	Blood stages	Apicoplast target ⁵⁷	Unknown

cr1, chloroquine-resistance transporter; *cytb*, cytochrome b; *dhfr*, dihydrofolate reductase; *dhps*, dihydropteroate synthase; *mdr1*, multidrug resistance protein; *pf*, *Plasmodium falciparum* gene; *pv*, *Plasmodium vivax* gene; *pfkelch13*, *P. falciparum* Kelch 13; *plm2*, plasmepsin 2. *Drug used in artemisinin-based combination therapy. ¹Antimalarial drug used alone or in combination for the treatment of *P. vivax* malaria. ⁵Antimalarial drug used alone or in combination with molecules other than artemisinin derivatives.

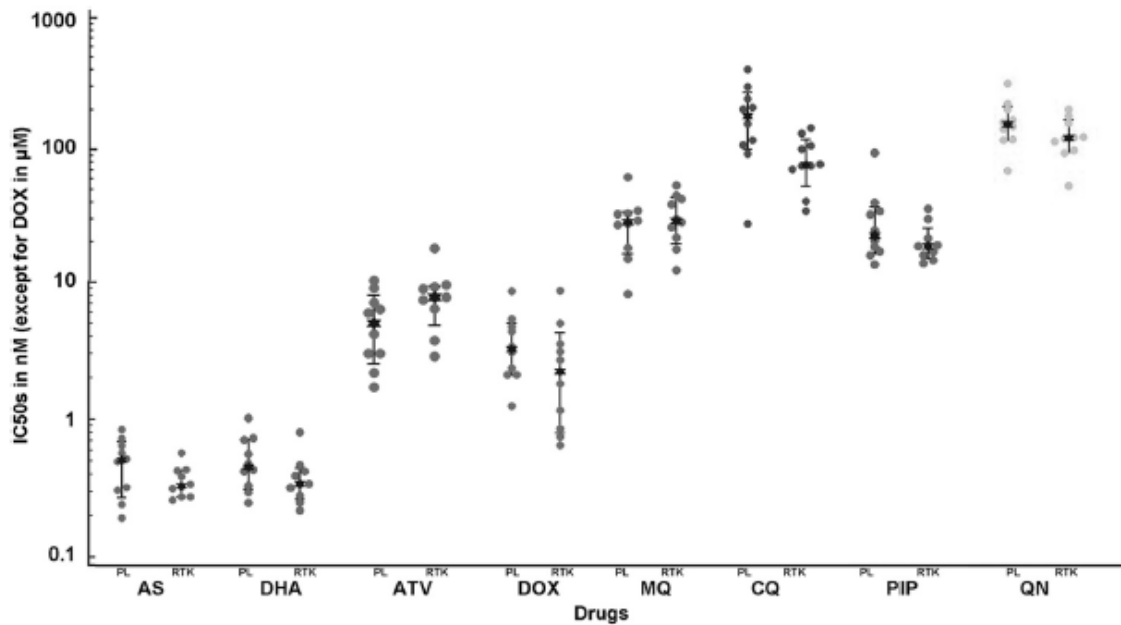
Annexe 17 : Evolution au cours du temps de la répartition de la chloroquinorésistance dans le monde. (Source : <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMp1403340>)



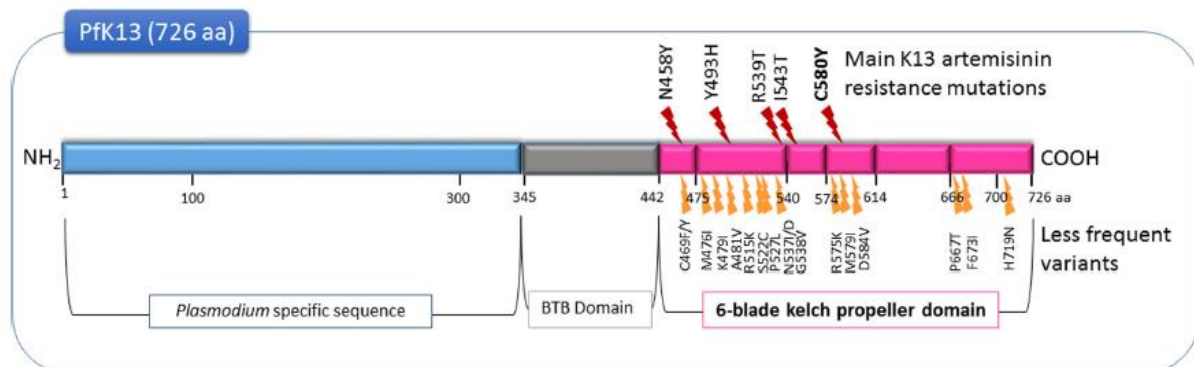
Annexe 18 : Répartition de trois résistances à des antipaludiques en Afrique et Asie du Sud-Est. (Source : Haldar K, Bhattacharjee S, Safeukui I. Drug resistance in Plasmodium. Nat Rev Microbiol. 2018;16(3):156-70)



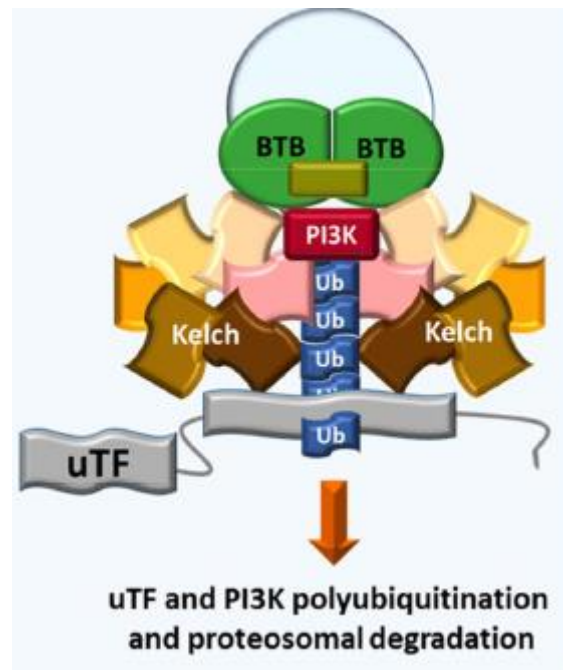
Annexe 19 : Nuages de points représentant l'IC₅₀ de plusieurs antipaludiques d'isolats parasitaires provenant de Palin (PL) et Ratanakiri (RTK). Abréviations : AS = artésunate ; DHA = dihydroartémisinine ; ATV = atovaquone ; DOX = Doxycycline ; MQ = Méfloquine ; CQ = Chloroquine ; PIP = Pipéraquline et QN = Quinine. (D'après Witkowski *et al.*⁶⁶)



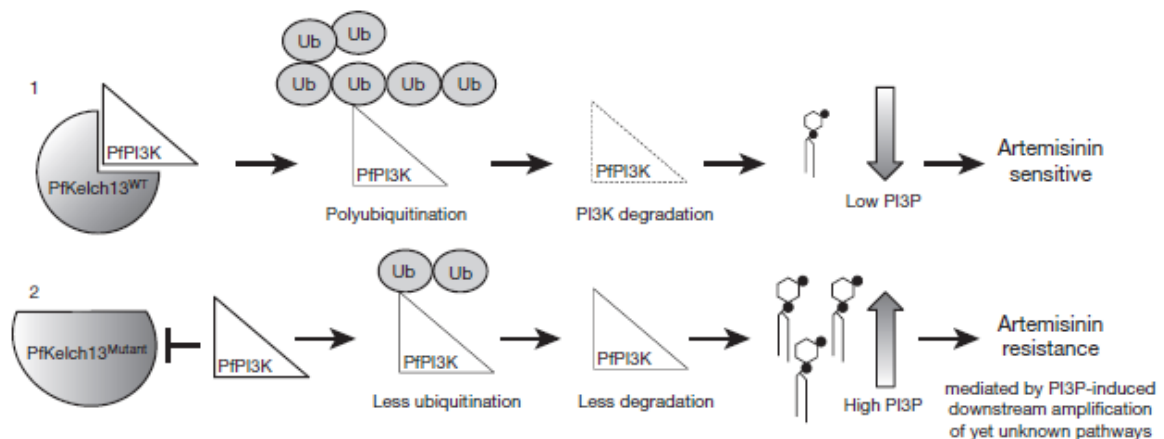
Annexe 20 : Représentation schématique des domaines de la protéine *Pfkelch13* et des mutations identifiées (en rouge, mutations prouvées comme étant associées avec une résistance à l'artémisinine). (Source : M. Ouji *et al.*: Parasite 2018, 25, 24)



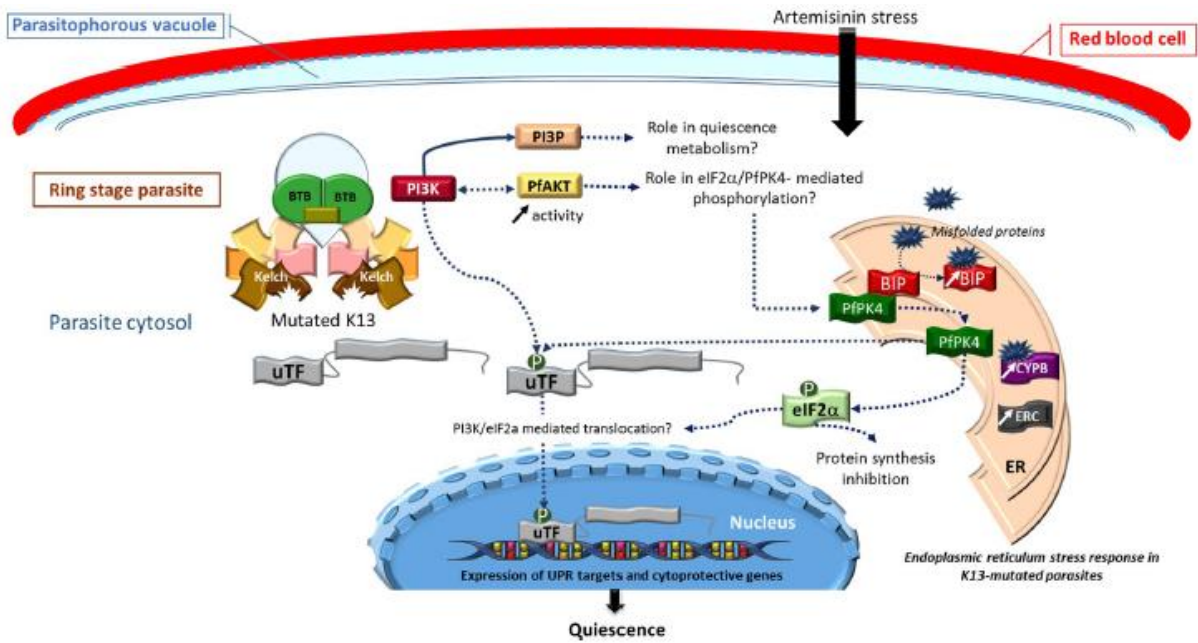
Annexe 21 Représentation schématique de la protéine *Pfkelch13* dimérisée et de son action. (PI3K = phosphatidylinositol 3-kinase ; Ub = ubiquitine ; uTF = unknown transcription factor). (D'après Paloque *et al.*⁴⁹)



Annexe 22 : Schéma représentant l'effet de la mutation de *Pfkelch13* sur le niveau de PI3P et de la résistance à l'artémisinine. (D'après Mbengué *et al.*⁷¹)



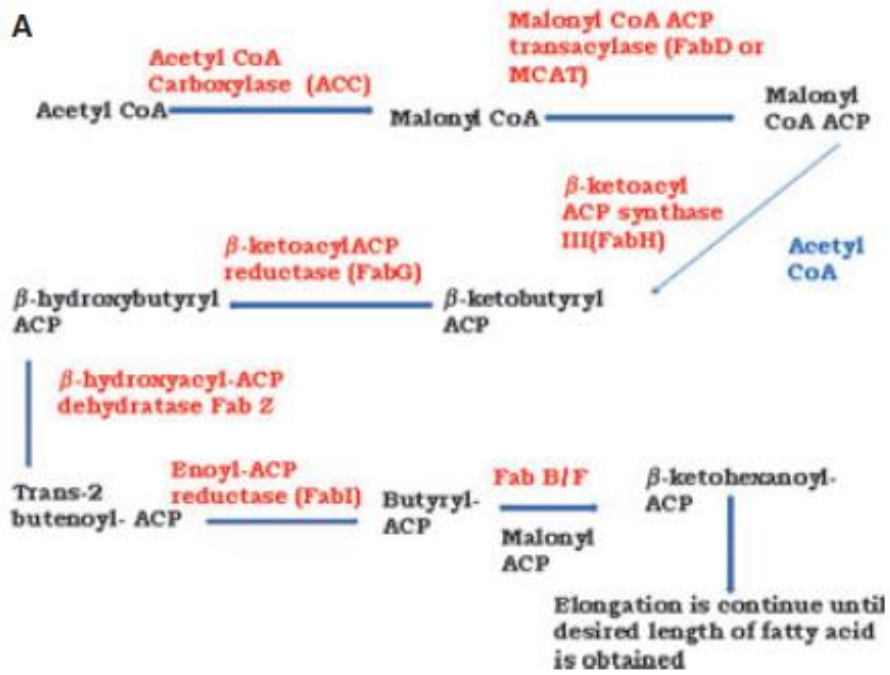
Annexe 23 : Voies de signalisations impactées par la mutation de la protéine *Pfkelch13*.
 (D'après Paloque *et al.*⁴⁹)



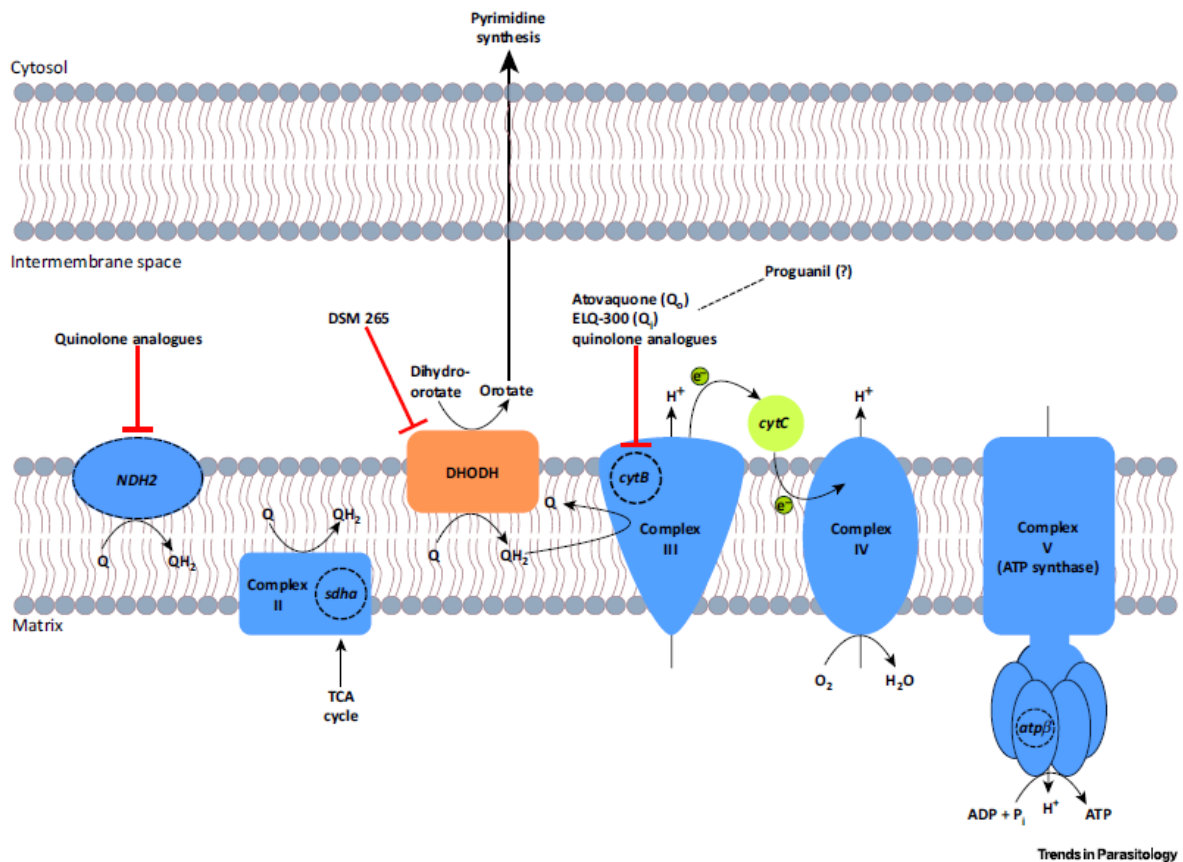
Annexe 24 : Nombre d'ACTs dans les pays d'Asie du sud-est avec un taux d'échec supérieur à 10%. (Source : OMS⁶³)



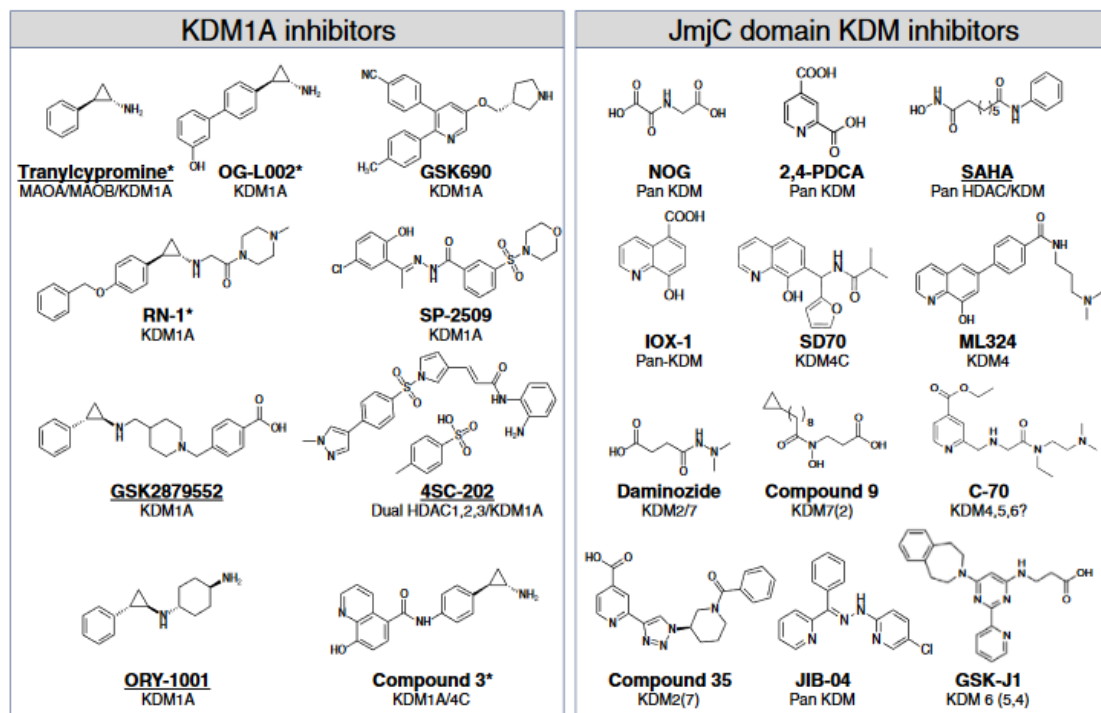
Annexe 25 : Voie de synthèse des acides gras. (D'après Qidwai et Khan⁸⁷)



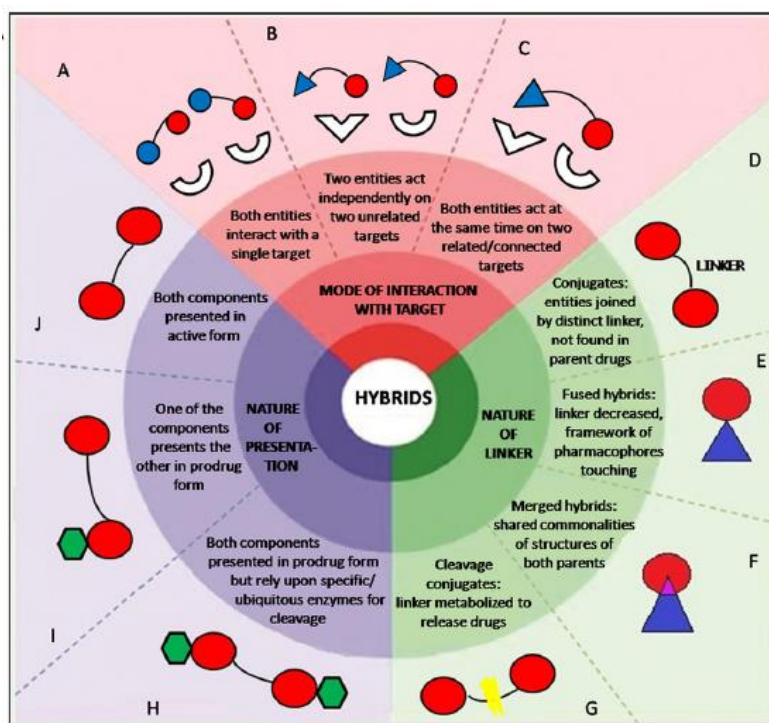
Annexe 26 : Chaîne respiratoire et molécules inhibitrices chez *Plasmodium*. (Source : Goodman CD, Buchanan HD, McFadden GI. Is the Mitochondrion a Good Malaria Drug Target? Trends Parasitol. 2017;33(3):185-93)



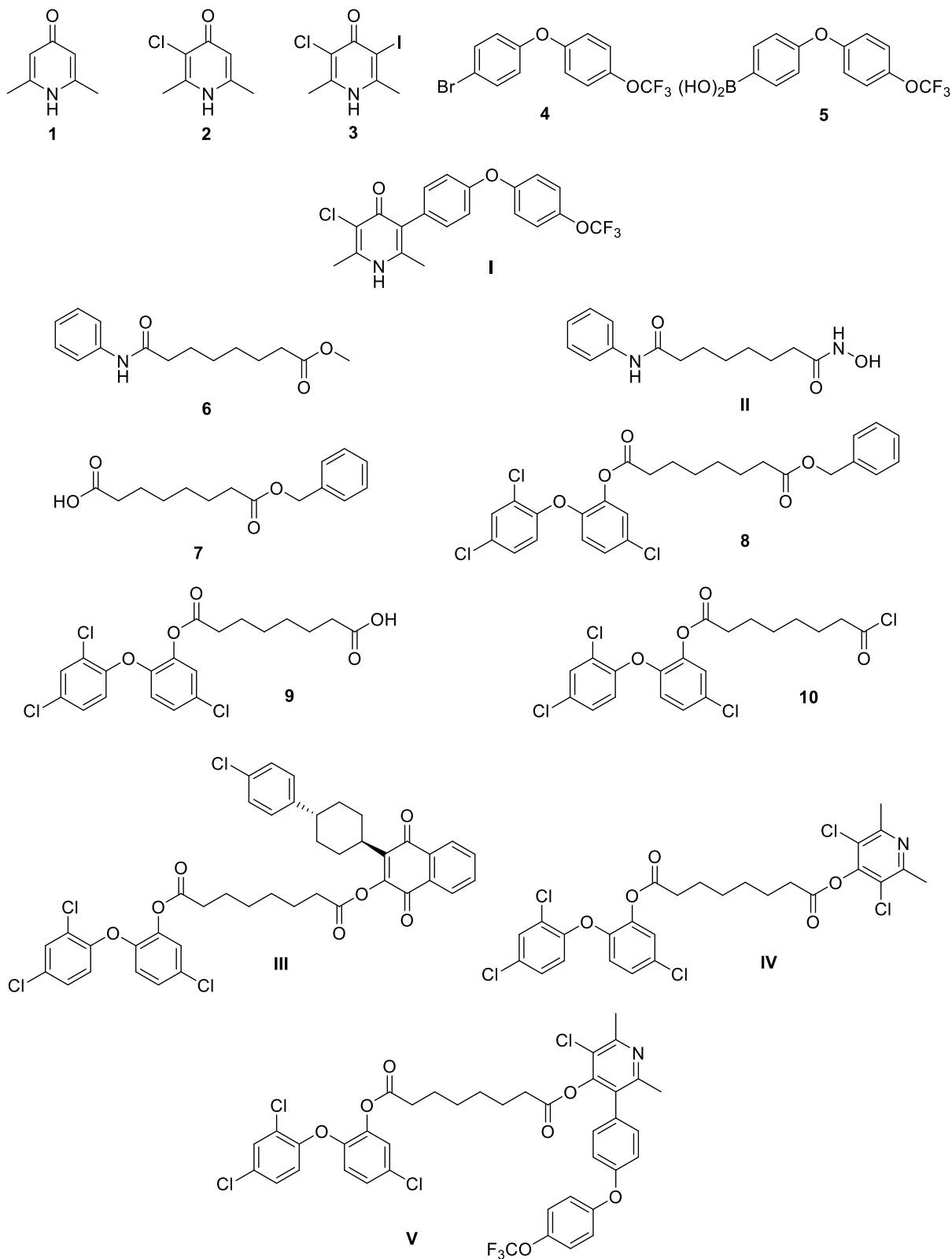
Annexe 27 : Structures chimiques de différents inhibiteurs de lysine déméthylases.
 (Source : Maes T, Carceller E, Salas J, Ortega A, Buesa C. Advances in the development of histone lysine demethylase inhibitors. Curr Opin Pharmacol. 2015;23:52-60)

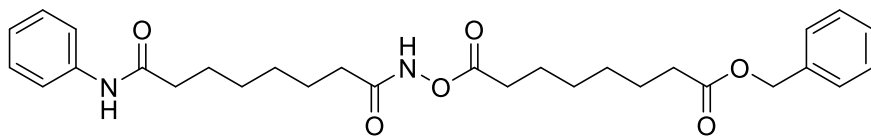


Annexe 28 : Classification des hybrides d'après leur mode d'interaction avec la cible, la nature du linker ou la forme des composants. (Source : Agarwal D, Gupta RD, Awasthi SK. Are Antimalarial Hybrid Molecules a Close Reality or a Distant Dream? Antimicrob Agents Ch. 2017;61(5):e00249-17)

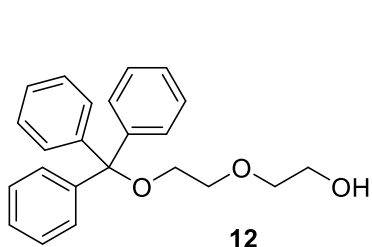


Annexe 29 : Structures chimiques des molécules décrites dans la partie expérimentale

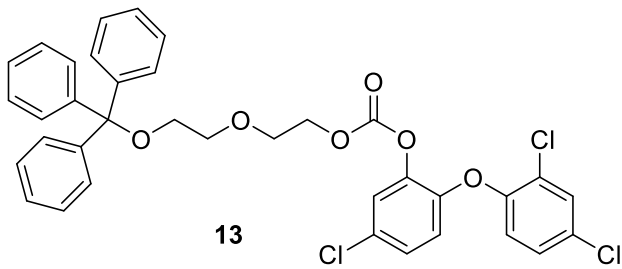




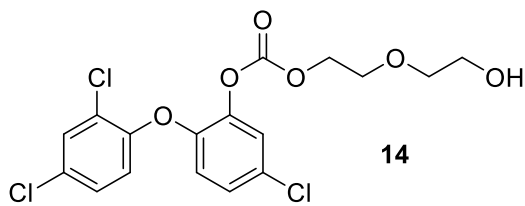
11



12



13



14



VU, LE PRESIDENT DU JURY

CAEN, LE

VU, LE DIRECTEUR DE LA FACULTE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

CAEN, LE

L'université n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses et mémoires. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs.

TITRE

MOLECULES HYBRIDES ANTIPLASMODIALES CIBLANT LES PARASITES RESISTANTS A L'ARTEMISININE

Résumé

Le paludisme, maladie parasitaire causée par *Plasmodium spp.* et transmise par les anophèles, est la parasitose la plus mortelle au monde. Les moyens de lutte préventive en association avec de nombreux médicaments à disposition a permis de réduire l'impact de cette maladie depuis les années 1990.

Ces progrès sont remis en question depuis quelques années par l'émergence d'une résistance à l'artémisinine et ses dérivés. Ces derniers, avec d'autres antipaludiques de classes thérapeutiques différentes, composent les thérapies combinées à base d'artémisinine, première ligne de traitement contre le paludisme. Le gène mutant responsable de la résistance est *Pfkelch13*, mis en évidence en 2010. Depuis, le mécanisme de résistance est connu : en présence d'un dérivé d'artémisinine, le parasite est capable de rentrer dans un état de quiescence le rendant insensible au traitement. Quelques voies métaboliques sont encore actives chez ces parasites quiescents et constituent des cibles potentielles pour éliminer ces parasites.

Ce document dresse un état des lieux actuel concernant le paludisme. Cet état des lieux permet d'introduire des travaux de chimie médicinale portant sur la synthèse de composés hybrides comportant des molécules actives sur les voies métaboliques encore actives chez les parasites quiescents.

TITLE

ANTIPLASMODIAL HYBRID MOLECULES TARGETING ARTEMISININ RESISTANT PARASITES

Summary

Malaria, parasitic disease caused by *Plasmodium spp.* and transmitted by anopheles, is the deadliest parasitic disease in the world. Preventive measures combined with many available drugs allowed to reduce the impact of this disease since the 90s.

Those advances are questioned for some years with the appearance of a resistance targeting artemisinin and its derivatives. Those derivatives, with other drugs of different therapeutic classes, form the artemisinin-based combined therapies, first line of treatment against malaria. The responsible mutated gene is *Pfkelch13*, highlighted on 2010. Since then, the resistance's mechanism is known: in presence of an artemisinin derivatives, the parasite is able to enter a quiescent stage thus inducing an insensitivity to treatment. Some metabolic pathways are still actives in those quiescent parasites, making them interesting targets to kill resistant parasites.

This document constitutes a review of the state of malaria. This review of the state allows to introduce medicinal chemistry works about the synthesis of hybrid compounds containing molecules targeting metabolic pathways that are still active in quiescents parasites.

Mots-clés

Paludisme – Résistance médicamenteuse – artémisinine – kelch13 – molécules hybrides
