



HAL
open science

Étude des modifications ultra-structurales précoces de Plasmodium falciparum soumis à la doxycycline par microscopie électronique

Erwan Tamic

► **To cite this version:**

Erwan Tamic. Étude des modifications ultra-structurales précoces de Plasmodium falciparum soumis à la doxycycline par microscopie électronique. Sciences pharmaceutiques. 2021. dumas-03537195

HAL Id: dumas-03537195

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03537195>

Submitted on 20 Jan 2022

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

THÈSE

PRESENTEE ET PUBLIQUEMENT SOUTENUE
DEVANT LA FACULTE DE PHARMACIE DE MARSEILLE

LE 18 OCTOBRE 2021

PAR

M. TAMIC Erwan

Né le 19/10/1993 à Lille

EN VUE D'OBTENIR

LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

----oOo----

Etude des modifications ultra-structurales précoces de *Plasmodium falciparum* soumis à la doxycycline par microscopie électronique

----oOo----

JURY :

Président : Mme le Professeur Nadine AZAS-KREDER

Membres : Mme le Docteur Coralie LOLLIVIER (Directeur de Thèse)

Mme le Docteur Estelle MENU

Mr le Docteur Leonardo BASCO

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05

Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

ADMINISTRATION :

<i>Doyen :</i>	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
<i>Vice-Doyens :</i>	M. Jean-Paul BORG, M. François DEVRED, M. Pascal RATHELOT
<i>Chargés de Mission :</i>	Mme Pascale BARBIER, M. David BERGE-LEFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, Mme Frédérique GRIMALDI, M. Guillaume HACHE
<i>Conseiller du Doyen :</i>	M. Patrice VANELLE
<i>Doyens honoraires :</i>	M. Patrice VANELLE, M. Pierre TIMON-DAVID,
<i>Professeurs émérites :</i>	M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Henri PORTUGAL, M. Philippe CHARPIOT
<i>Professeurs honoraires :</i>	M. Guy BALANSARD, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI
<i>Chef des Services Administratifs :</i>	Mme Florence GAUREL
<i>Chef de Cabinet :</i>	Mme Aurélie BELENGUER
<i>Responsable de la Scolarité :</i>	Mme Nathalie BESNARD

**DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE
PHARMACEUTIQUE**
Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

PROFESSEURS

BIOPHYSIQUE	M. Vincent PEYROT M. Hervé KOVACIC
GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE	M. Christophe DUBOIS
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE	M. Philippe PICCERELLE

**MAITRES DE
CONFERENCES**

BIOPHYSIQUE	M. Robert GILLI Mme Odile RIMET-GASPARINI Mme Pascale BARBIER M. François DEVRED Mme Manon CARRE M. Gilles BREUZARD Mme Alessandra PAGANO
GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE	M. Eric SEREE-PACHA Mme Véronique REY-BOURGAREL
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE	M. Pascal PRINDERRE M. Emmanuel CAUTURE Mme Véronique ANDRIEU Mme Marie-Pierre SAVELLI
BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE ET BIOTHERAPIES PHARMACO ECONOMIE, E-SANTE	M. Jérémy MAGALON Mme Carole SIANI

**ENSEIGNANTS
CONTRACTUELS**

ANGLAIS	Mme Angélique GOODWIN
---------	-----------------------

**DEPARTEMENT BIOLOGIE
PHARMACEUTIQUE**

Responsable : Professeur Françoise
DIGNAT-GEORGE

PROFESSEURS

BIOLOGIE CELLULAIRE	M. Jean-Paul BORG
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE Mme Laurence CAMOIN-JAU Mme Florence SABATIER-MALATERRE Mme Nathalie BARDIN
MICROBIOLOGIE	M. Jean-Marc ROLAIN M. Philippe COLSON
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Nadine AZAS-KREDER

MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	M. Thierry AUGIER M. Edouard LAMY Mme Alexandrine BERTAUD Mme Claire CERINI Mme Edwige TELLIER M. Stéphane POITEVIN
BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	M. Thierry AUGIER M. Edouard LAMY Mme Alexandrine BERTAUD Mme Claire CERINI Mme Edwige TELLIER M. Stéphane POITEVIN
MICROBIOLOGIE	Mme Michèle LAGET Mme Anne DAVIN-REGLI Mme Véronique ROUX M. Fadi BITTAR Mme Isabelle PAGNIER Mme Sophie EDOUARD M. Seydina Mouhamadou DIENE
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ZOOLOGIE	Mme Carole DI GIORGIO M. Aurélien DUMETRE Mme Magali CASANOVA

BIOLOGIE CELLULAIRE

Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

ATER

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE

Mme Anne-Claire DUCHEZ

BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE

Mme Alexandra WALTON

A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Mélanie VELIER

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

Mme Catherine BADENS

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES
NUISANCES TECHNOLOGIQUES

M. David BERGE-LEFRANC

CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE –
CHIMIE THERAPEUTIQUE

M. Pascal RATHELOT

M. Maxime CROZET

CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE

M. Patrice VANELLE

M. Thierry TERME

PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOGNOSIE

Mme Evelyne OLLIVIER

**MAITRES DE
CONFERENCES**

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE, BIOLOGIE
CELLULAIRE

Mme Anne FAVEL

Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

Mme Catherine DEFOORT

M. Alain NICOLAY

Mme Estelle WOLFF

Mme Elise LOMBARD

Mme Camille DESGROUAS

M. Charles DESMARCHELIER

CHIMIE THERAPEUTIQUE

Mme Sandrine ALIBERT

Mme Caroline DUCROS

M. Marc MONTANA

Mme Manon ROCHE

Mme Fanny MATHIAS

CHIMIE ORGANIQUE
PHARMACEUTIQUE HYDROLOGIE

M. Armand GELLIS
M. Christophe CURTI
Mme Julie BROGGI
M. Nicolas PRIMAS
M. Cédric SPITZ
M. Sébastien REDON

PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE

M. Riad ELIAS
Mme Valérie MAHIOU-LEDDDET
Mme Sok Siya BUN
Mme Béatrice BAGHDIKIAN

**MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS
PARTIEL (M.A.S.T)**

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET
NUTRITION

Mme Anne-Marie PENET-LOREC

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES
RISQUES ET NUISANCES
TECHNOLOGIQUES

M. Cyril PUJOL

DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE

M. Marc LAMBERT

GESTION PHARMACEUTIQUE,
PHARMACOECONOMIE ET ETHIQUE
PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET
COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A
L'OFFICINE ET GESTION DE LA PHARMAFAC

Mme Félicia FERRERA

A.H.U.

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET
NUTRITION

M. Mathieu CERINO

ATER

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES
RISQUES ET NUISANCES
TECHNOLOGIQUES

M. Duje BURIC

**DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE
SANITAIRE**

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS

PHARMACIE CLINIQUE	M. Stéphane HONORÉ
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Bruno LACARELLE Mme Frédérique GRIMALDI M. Joseph CICCOLINI

**MAITRES DE
CONFERENCES**

PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlem BOUHLEL M. Philippe GARRIGUE
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL
TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	Mme Raphaëlle FANCIULLINO Mme Florence GATTACECCA
TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE	M. Pierre-Henri VILLARD Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE

A.H.U.

PHYSIOLOGIE / PHARMACOLOGIE PHARMACIE CLINIQUE	Mme Anaïs MOYON M. Florian CORREARD
---	--

ATER.

TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	Mme Anne RODALLEC
----------------------------------	-------------------

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Marie-Hélène BERTOCCHIO,
Pharmacien-Praticien hospitalier Mme

Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-
Praticien hospitalier

M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Sylvain GONNET,
Pharmacien titulaire

Mme Florence

LEANDRO,

Pharmacien adjoint

M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire

M. Patrick REGGIO, Pharmacien conseil, DRSM de l'Assurance Maladie

Mme Clémence TABELLE,
Pharmacien-Praticien attaché

Mme TONNEAU-PFUG,
Pharmacien adjoint

M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier

M. Joël VELLOZZI, Expert-Comptable

Mise à jour le 23 janvier
2020

Remerciements

Aux membres du Jury

A Madame la Professeur Nadine Azas. Vous avez bien voulu me faire l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse. Soyez assurée de ma sincère gratitude et de mon profond respect.

A Madame le Docteur Coralie Lollivier. Merci de me faire l'honneur de diriger cette thèse. Je te remercie pour ta disponibilité, ton expertise, ton soutien et ton acharnement face aux petites galères qui m'ont permis de finaliser ce travail. Ta pédagogie et ta rigueur de travail m'ont beaucoup appris. Merci à toi.

A Madame le Docteur Estelle Menu. Je suis ravi que tu aies accepté de juger ce travail. Ton intelligence ainsi que ta pédagogie m'ont toujours impressionné depuis nos débuts en tant qu'interne et jusqu'à aujourd'hui. Merci à toi.

A Monsieur le Docteur Leonardo Basco. Merci de m'avoir fait l'honneur d'accepter de rejoindre ce jury et de juger ce travail.

Aux personnes m'ayant aidé dans ce travail

A Monsieur l'ingénieur Sébastien Hutter. Merci pour ton travail et ton expertise dans la culture cellulaire qui m'ont été indispensables à réaliser ces manipulations.

A Monsieur l'ingénieur Fabrizio Di Pinto. Merci pour ton aide et tes conseils sur la microscopie électronique.

Au CNR paludisme, merci pour votre aide dans la réalisation de ce travail.

Je dédie cette thèse à :

A mon père, ma mère et ma sœur.

A vous mes emmerdeurs préférés, grâce à vous j'ai forgé ma force de caractère. Vous m'avez appris les valeurs du travail et de la détermination. Merci pour tout ce vous avez fait et tout ce que vous continuez à faire pour moi.

A mes grands-parents

Les crevettes et les canards comme j'aime à les appeler depuis ma plus tendre enfance. Merci d'avoir participé à mon éducation, et de m'avoir procuré tant de moments de bonheur depuis que je suis petit.

A ma mamie crevette partie trop tôt, je sais que tu aurais été fière de moi.

A mon papi canard, tu resteras un modèle de travail pour moi.

Aux fils, Merci pour toutes ces années de rire, de travail, de fêtes et d'esbroufes.

Merci à Mamelia, loin des fils mais près du cœur. Je sais que tu t'amuses bien à Tahiti mais il va être temps de revenir définitivement afin de pouvoir repartager de francs moments de rigolade.

Merci à Remy, pour tous ces délires et tes cuites mémorables. Il nous reste quelques plaques de placo à terminer. Travailler en musique avec toi comme frère d'arme est un vrai plaisir. J'ai hâte de découvrir tes prochaines cachettes de dodo à 3 grammes.

Merci à Marcelino, pour tous ces trolls au point de ne plus savoir toi-même si tu trolles ou non.

Merci à Popette pour ces moments de rire et de conseils capillaires.

Merci à Monégasque, pour ta bonne humeur et ton humour décapant.

Merci à Chatouf, Sam pour votre amitié.

A la best, la seule, l'unique. Merci Maurine d'être là.

Ça commence à faire un moment qu'on se suit. J'apprécie tous les jours ta joie de vivre. Que de soirées endiablées et de bêtises dans lesquelles tu m'as enrôlé. Merci pour cette complicité.

Merci aux copains d'assos pour toutes ces réunions interminables, ces bons moments de rigolade, ces cuites et ces gueules de bois imprévues. A mes yeux, notre amitié dépasse de loin le cadre de l'asso, mais ça vous le savez déjà. Je jubile d'avance des retrouvailles et des soirées à venir à mon retour sur le continent.

Merci à Planplan, pour être mon compagnon de daronnage. Assurément tu es une de mes plus belles rencontres de Marseille. Notre amitié est à l'image d'une bonne vieille barrique qui ne fait que se bonifier avec le temps. Hâte de déboucher quelques bouteilles en ta compagnie.

Merci à Thibault la Grisinger, un air si parfait pour un homme si parfait. Tu es une belle personne, ne change surtout pas.

Merci à Casto, mein führer. Tu es intransigeante en travail et j'admire beaucoup cette qualité. Tu es aussi une bonne amie, mais essayes de plus tomber en panne à Nord à 23h s'il te plait.

Erwann n2, à jamais le numéro 2 mais ça ne t'empêche pas d'être numéro 1 dans mon cœur.

Pepito, quelle belle rencontre. Ne pars pas habiter aux Antilles, je t'apprécie trop pour te voir partir.

Bantchi, on a appris à se dompter. J'apprécie beaucoup ton entièreté. Il va falloir programmer une plongée sous peu.

Yayha gros canon, merci pour tous ces mêmes de qualité, il me tarde de refaire quelques battles.

Juju, merci de rigoler à mes blagues même les plus vaseuses.

Merci à la chambre Covid et à mes amis d'internat Lola, Margaux, Emy, Cecilia, Alexis.

On a partagé bien des choses dont la même souche de Covid19. Merci pour tous ces moments de scandales, de rires et de cuites. Il va être temps de remettre tout ça.

Merci à mes amis de la faculté de Nantes pour toutes ces soirées ti'punch et ce qui va avec.

Merci à Claire de m'avoir supporté et d'avoir été mon binôme de concours. Je suis persuadé que notre alliance et notre persévérance ont été un combo gagnant dans la dernière ligne droite du concours.

Merci à Agathe, ma partenaire de bitchage et de cuisine.

Merci à Charles, pour tous ces moments de rires et de soirées

Merci à Emilie qui a su me donner la bonne direction pour réussir le concours de l'internat.

Merci à Allan pour tous ces moments d'esbroufe, j'ai quelques amis d'esbroufe à te présenter quand tu passeras sur Marseille, vous allez vous entendre à merveille.

Merci à la team Corse pour ce semestre de folie, quelle tristesse de vous quitter ainsi que l'île de beauté. J'espère qu'on aura l'occasion de se recroiser.

Merci Keke juste parce que ça t'énerve qu'on t'appelle comme ça, tu es assurément une belle rencontre et un bon ami.

Roxane Yaël, la D, la C, Krystel, Léa, Laura, Consti, Mélina, Gildas et Alice, Oliv', Manon, Marilou, Adam et Reem, Margaux, Kiki, Valentine, Jeanne merci pour tous ces bons moments, ces randonnées, ces soirées.

Merci à Emma pour ton soutien au cours de cette année, et des bons moments que l'on a pu vivre ensemble.

Merci à tous les potos, mes anciens co-internes, mes collègues de travail que je n'ai pas cités.

Merci à Polette. Tu es une amie que j'apprécie. Tu es une personne sur qui je peux compter, la preuve en est avec ton aide de dernière minute sur ma thèse en catastrophe. Encore merci.

Merci à PRP pour ton humour et pour avoir été mon premier co interne de travail.

Merci au laboratoire d'Ajaccio et de Gap pour ces derniers mois.

Trugarez.

Breiz Atao.

*« L'Université n'entend donner aucune approbation, ni improbation
aux opinions émises dans les thèses. Ces opinions doivent être
considérées comme propres à leurs auteurs. »*

TABLE DES MATIERES :

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	2
LISTE DES ABREVIATIONS.....	5
INTRODUCTION.....	7
PARTIE 1 : GÉNÉRALITÉS ET REVUE DE LA LITTÉRATURE	8
1.1 Généralités sur le paludisme.....	8
1.1.1 Répartition du paludisme dans le monde.....	8
1.1.2 Les Vecteurs	8
1.1.3 Répartition des différentes espèces de <i>Plasmodium</i>	11
1.1.4 Cycle du parasite	13
1.1.5 Morphologie parasitaire intra érythrocytaire en microscopie optique	15
1.1.6 Données épidémiologiques du paludisme	18
1.1.7 Diagnostic biologique.....	20
1.1.8 Prise en charge du paludisme à <i>Plasmodium falciparum</i>	22
1.2 Place de la doxycycline dans la stratégie anti palustre	29
1.2.1 Pharmacologie	29
1.2.2 Traitement curatif et chimio prophylactique, posologie, résistance, tolérance	31
1.2.3 Mécanisme d'action	37
1.3 La microscopie électronique dans l'étude morphologique de <i>Plasmodium falciparum</i>	41
1.3.1 Principes généraux de la microscopie électronique à transmission	41
1.3.2 Observation de <i>Plasmodium falciparum</i> en MET et description de son ultrastructure.....	49
PARTIE 2 : ÉTUDE DE <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i> EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION SOUMIS A LA DOXYCYCLINE	71
2.1 Matériel et méthode.....	72
2.1.1 Culture in vitro de <i>Plasmodium falciparum</i>	72
2.1.2 Traitement par doxycycline des cultures de <i>Plasmodium falciparum</i>	76
2.1.3 Microscopie électronique à transmission de <i>Plasmodium falciparum</i> soumis à la doxycycline	77
2.2 Résultats	83
2.2.1 Effets sur la parasitémie	85
2.2.2 Modifications morphologiques de la chimiothérapie sur l'ultrastructure parasitaire en microscopie électronique à transmission	87
2.3 Discussion	99
CONCLUSION.....	107
REFERENCES (ISO 1690).....	108

Liste des figures et tableaux

Liste des figures :

Figure 1 :	Carte de la transmission globale du paludisme à travers le Monde	8
Figure 2 :	Carte mondiale de répartition des Anophèles capables de transmettre le paludisme	9
Figure 3 :	Aire de répartition de <i>Plasmodium falciparum</i> , <i>Plasmodium ovale</i> , <i>Plasmodium vivax</i> , <i>Plasmodium malariae</i> 2016	11
Figure 4 :	Carte du nombre de cas de paludisme à <i>Plasmodium knowlesi</i> en 2014 en Asie de l'Est	13
Figure 5 :	Schéma du cycle parasitaire de <i>Plasmodium sp</i>	13
Figure 6 :	Cycle plasmodiale érythrocytaire chez <i>Plasmodium falciparum</i>	14
Figure 7 :	Logigramme du diagnostic biologique du paludisme	20
Figure 8 :	Algorithme de décision chez l'adulte dans la prise en charge d'accès simple palustre issue de la société de pathologie infectieuse de langue française (SPILF)	27
Figure 9 :	Algorithme de décision chez l'enfant pour la prise en charge d'accès simple palustre issue de la société de pathologie infectieuse de langue française	28
Figure 10 :	Structure chimique doxycycline	29
Figure 11 :	Observation par microscopie à fluorescence d'organelles de <i>P. falciparum</i> soumis à la doxycycline 1 μ M	38
Figure 12 :	Schéma de représentation du domaine ondulatoire des sources électromagnétiques	42
Figure 13 :	Schéma d'un microscope électronique à transmission	44
Figure 14 :	Représentation d'un échantillon n perspective et de sa coupe	46
Figure 15 :	Représentation schématique d'une coupe d'échantillon sur une grille en cuivre	46
Figure 16 :	Comportement des électrons dans une colonne de MET au passage d'un échantillon	47
Figure 17 :	Schéma de déviation des électrons dans une observation en MET	47
Figure 18 :	Représentation de la formation d'image en MET	48
Figure 19 :	Images en MET d'un mérozoïte de <i>P. falciparum</i> avec observation de protéines MSP1.	51
Figure 20 :	Image en MET d'un mérozoïte de <i>P. falciparum</i> avec visualisation des membranes et des organelles	51
Figure 21 :	Représentation schématique d'un mérozoïte avec visualisation des organelles	53
Figure 22 :	Représentation schématique d'un trophozoïte jeune avec visualisation des organelles ..	55
Figure 23 :	Section transversale d'un trophozoïte jeune en anneau en MET	56
Figure 24 :	Images de <i>Plasmodium falciparum</i> au stade anneau parasitaire observées et reconstruites par tomographie	56
Figure 25 :	Images en MET de cytotomes et de corps osmiophiles de <i>Plasmodium falciparum</i>	57
Figure 26 :	Images en MET d'un trophozoïte jeune de <i>Plasmodium falciparum</i> et de cristaux d'hémozoïnes	57
Figure 27 :	Représentation schématique d'un trophozoïte avec visualisation des organelles	58
Figure 28 :	Image en MET d'un trophozoïte mature de <i>Plasmodium falciparum</i> et de la vacuole digestive	59
Figure 29 :	Images en MET d'un trophozoïte mature de <i>Plasmodium falciparum</i> et des cristaux d'hémozoïne dans la VD	59
Figure 30 :	Images en MET d'un trophozoïte mature de <i>Plasmodium falciparum</i> et d'un acidocalcisome, apicoplaste et mitochondrie	60
Figure 31 :	Image en MET d'un érythrocyte infecté par <i>Plasmodium falciparum</i> au stade trophozoïte mature et d'un appareil de Golgi	61
Figure 32 :	Images en MET de <i>Plasmodium falciparum</i> au stade trophozoïte avec visualisation des Knobs et des vésicules denses	63

Figure 33 : Images en MET de <i>Plasmodium falciparum</i> avec visualisation des Knobs et des taches de Maurer	63
Figure 34 : Images en MET de <i>Plasmodium falciparum</i> et des structures taches de Maurer et tethers	64
Figure 35 : Images en MET d'un érythrocyte infecté par <i>Plasmodium falciparum</i> et des stades finaux de la schizogonie	65
Figure 36 : Image en MET d'un schizonte de <i>Plasmodium falciparum</i> à 8 /16 noyaux	66
Figure 37 : Image en MET d'un schizonte <i>Plasmodium falciparum</i> 8/16 noyaux et des structures appareil de Golgi	67
Figure 38 : Représentation schématique d'un schizonte 8 / 16 noyaux avec visualisation des organelles	67
Figure 39 : Schéma du développement du réseau mitochondrial et apico-plastique au cours du développement de <i>Plasmodium falciparum</i>	68
Figure 40 : Image en MET d'une rhoptrie en maturation de <i>Plasmodium falciparum</i>	69
Figure 41 : Représentation du cycle parasitaire in vitro de la souche <i>Plasmodium falciparum</i> 3D7 et description des différents stades parasitaires observés	73
Figure 42 : Schéma des plans de plaque de culture in vitro de <i>Plasmodium falciparum</i> soumis à chimiothérapie par doxycycline 11.6 µM	77
Figure 43 : Schizontes de <i>Plasmodium falciparum</i> colorés par MGG et observés en microscopie optique.	87
Figure 44 : Image en MET d'un trophozoïte jeune de <i>Plasmodium falciparum</i> issue du témoin (-) à t=48h.....	88
Figure 45 : Image en MET d'un trophozoïte âgé de <i>Plasmodium falciparum</i> issue du témoin (-) à t=48h.....	89
Figure 46 : Images A, B, C en MET de schizontes de <i>Plasmodium falciparum</i> issues du témoin (-) à t=48h.....	90
Figure 47 : Images A, B, C en MET de de <i>Plasmodium falciparum</i> issues du témoin (-) à t=48h.....	91
Figure 48 : Images A, B, C en MET de schizontes de <i>Plasmodium falciparum</i> à t=48h traités par doxycycline 11.6 µM avec plusieurs vacuoles digestives.....	93
Figure 49 : Images en MET de schizontes de <i>Plasmodium falciparum</i> à t=48h traités par doxycycline 11.6µM : mise en évidence des structures membraneuses monocouches dans le cytoplasme de l'érythrocyte infecté	95
Figure 50 : Image en MET de schizonte de <i>Plasmodium falciparum</i> à t=48h traité par doxycycline 11.6 µM avec nombreuses structures membraneuses	96
Figure 51 : Image MET de schizontes traités par doxycycline 11.6 µM à t=48h de <i>Plasmodium falciparum</i> avec anomalie de la vacuole digestive	97
Figure 52 : Schizonte jeune de <i>Plasmodium falciparum</i> traité par doxycycline 11,6 µM à t=0h observé en MET : visualisation d'une mitochondrie	98
Figure 53 : Images en MET de la fragmentation de la vacuole digestive de <i>Plasmodium falciparum</i> soumis à 50µM d'indolmycine	103

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Reconnaissance des différents stades et espèces de Plasmodium sp d'intérêt clinique en médecine humaine	15
Tableau 2 : Principales molécules anti-palustres employées et mécanisme d'action.	22
Tableau 3 : Critères de gravité du paludisme grave issue de réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP) de 2007 actualisé en 2017)	25
Tableau 4 : Paramètres pharmacocinétiques de la doxycycline in vivo chez l'homme	30
Tableau 5 : CI50s de la souche 3D7	73
Tableau 6 : Tableau de correction d'acidité du tampon cacodylate 0,4N à conserver à 4 °C.....	79
Tableau 7 : Tableau d'obtention des différents titres d'alcool.....	80
Tableau 8 : Description des parasitémies de Plasmodium falciparum traités et non traités par doxycycline 11.6µM.....	85

Liste des abréviations

ACT :	Artemisinin-based combination therapy (combinaison thérapeutique à base d'artémisinine)
ARNt :	Acide ribonucléique de transfert
ATU :	Autorisation temporaire d'utilisation
CCD :	Charged coupled devices
CDC :	Centres pour le contrôle et la prévention des maladies
CI 50 :	Concentration minimale inhibitrice 50 % parasitémie
CNR :	Centre national de référence
CO ₂ :	Dioxyde de carbone
CP :	Chimio prophylaxie
Ct :	Cytostome
DHOD :	Dihydroorotate déshydrogénase
DHPS :	Dihydroptéroate synthase
dNTPs :	2'-deoxynucleoside- 5'-triphosphates
EFS :	Etablissement français du sang
ELISA :	Enzyme-linked immunosorbent assay : technique d'immunoabsorption par enzyme liée
FR :	Fréquence respiratoire.
GR :	Globule rouge
HAS :	Haute autorité de santé
Hb :	Hémoglobine
HCl :	Acide chlorhydrique
HRP2 :	L'Histidine-rich protein-2
IV :	Intra veineuse
IHU :	Institut hospitalo-universitaire
KAHRP :	Knobs Associated Histidin Rich Protein
LAMP :	Amplification isothermique sans extraction d'ARN
LDH :	Lactate déshydrogénase
MET :	Microscopie électronique à transmission
MGG :	May-Grünwald Giemsa
mL :	Millilitre
MM :	Masse molaire
mOsm :	Milliosmole
MSP :	Protéine de surface mérozoïtaires
N ₂ :	Diazote

NaCl : Chlorure de sodium
NTPs : Nucleoside-5'-triphosphates
O2 : Dioxygène
OMS : Organisation mondiale pour la santé
PCR : Réaction polymérique en chaine
PfEMP-1 : *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1
QBC : Quantitativ buffy coat
QSP : Quantité suffisante pour
RCP : Réunion de concertation pluridisciplinaire
RPM : Rotation par minute
RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium RPMI
RPS10 : Milieu de culture RPMI supplémenté 10% sérum humain
SPILF : Société de pathologie infectieuse de langue française
TDR : Test diagnostic rapide
VD : Vacuole digestive
VE : Vésicule endocytique
VM : Ventilation mécanique
VNI : Ventilation non invasive
3D : Trois dimensions
2D : Deux dimensions

INTRODUCTION

Le paludisme également connu sous le nom de malaria est une maladie due à des parasites du genre *Plasmodium* transmis à l'homme par des piqûres de moustiques femelles de l'espèce *Anophèles*. Elle constitue la première endémie parasitaire humaine mondiale et est un problème majeur de santé publique.

Aujourd'hui encore l'homme cherche des moyens de lutte et de contrôle du paludisme. Ces actions ont parfois permis de restreindre les aires de répartition géographique de la maladie, de proposer de nouvelles thérapeutiques efficaces et d'améliorer la prise en charge des malades. Surtout, ces dernières décennies de recherche ont permis la mise au point de nouvelles molécules thérapeutiques, dont l'efficacité a été établie de façon incontestable du point de vue clinique. Néanmoins leurs mécanismes d'action sont partiellement compris.

L'imparfaite connaissance de cet arsenal thérapeutique constitue un frein dans son utilisation, son optimisation, ainsi que dans le développement de nouvelles molécules dérivées. Ce besoin est d'autant plus grand du fait qu'une course à la résistance est engagée avec *Plasmodium falciparum* depuis plusieurs décennies, mettant en sursis les populations exposées au paludisme.

Concernant la stratégie thérapeutique anti-plasmodiale actuelle, la doxycycline bénéficie d'un regain d'intérêt. Cet antibiotique possède des propriétés antiparasitaires et constitue donc un axe de développement intéressant pourtant encore balbutiant.

Au gré des réflexions scientifiques et des innovations technologiques, les travaux scientifiques se succèdent et complètent l'édifice de la connaissance. Une compréhension plus avancée de cette famille d'antibiotiques, de son mécanisme d'action, de sa tolérance, de ses propriétés pharmacodynamiques et cinétiques permettrait d'optimiser son usage ainsi que de ses potentiels dérivés dans la lutte antipaludique.

L'objet de cette thèse va dans ce sens, et a été de s'intéresser spécifiquement à l'action précoce de la doxycycline sur l'espèce *Plasmodium falciparum*. Cet exercice a été réalisé au travers d'une revue de la littérature et par la réalisation de travaux pratiques. Ces derniers ont consisté à l'étude des altérations morphologiques de *P. falciparum* soumis à la doxycycline au moyen d'une observation par microscopie électronique à transmission.

PARTIE 1 : GÉNÉRALITÉS ET REVUE DE LA LITTÉRATURE

1.1 Généralités sur le paludisme

1.1.1 Répartition du paludisme dans le monde

Le paludisme ne sévit pas sur tout le globe, mais les migrations des populations entre les continents et le tourisme donnent à cette maladie une envergure mondiale. Sa répartition suit la ceinture équatorienne et est étroitement liée à la répartition de son vecteur (Figure 1) (1).

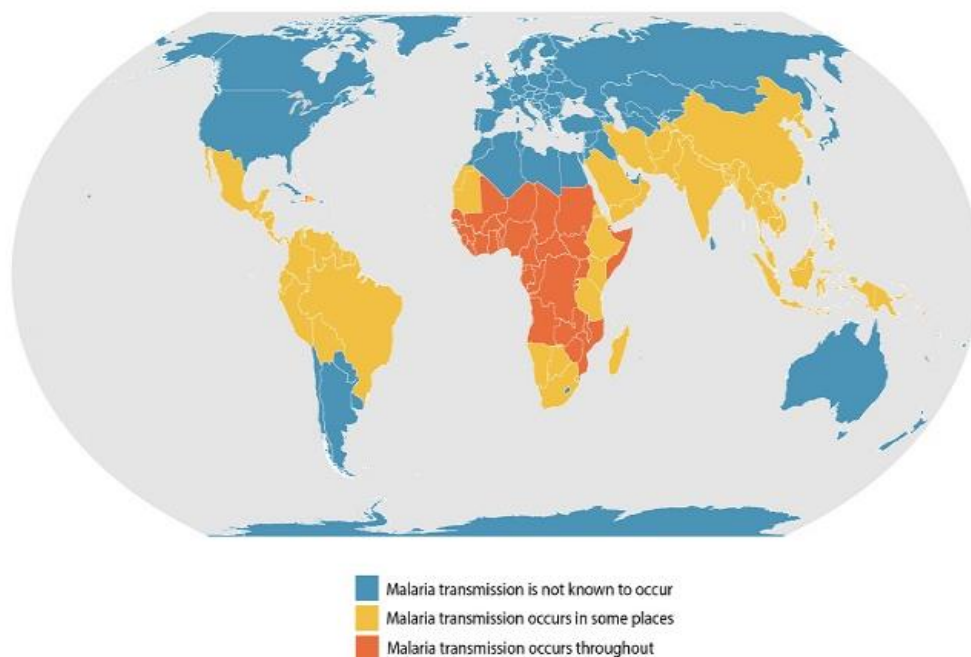


Figure 1 : Carte de la transmission globale du paludisme à travers le Monde (1)

1.1.2 Les Vecteurs

Répartition géographique :

La répartition mondiale du paludisme est conditionnée par la compétence vectorielle des Anophèles. La surveillance de l'évolution de l'épidémiologie de ces vecteurs hématophages porteurs de *Plasmodium* est cruciale. En effet, la lutte contre le vecteur occupe une place importante dans la stratégie de lutte contre le paludisme.

On recense plus de 3 000 espèces de moustiques dans le monde du genre *Anophèles*, avec seulement une soixantaine d'espèces capables de transmettre le paludisme à l'homme (Figure 2) (2). Et parmi celles-ci, une dizaine est responsable de plus de 99% des cas de transmission au niveau mondial (2).

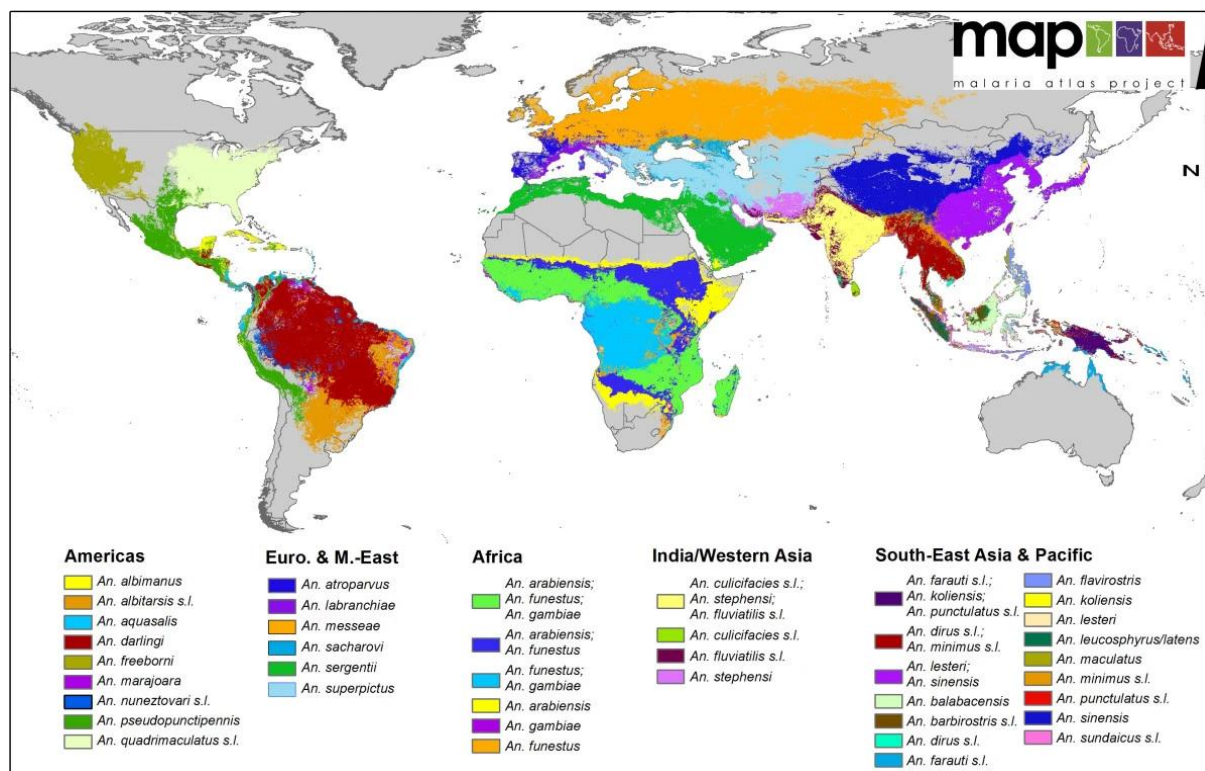


Figure 2 : Carte mondiale de répartition des Anophèles capables de transmettre le paludisme (3)

Légende : Americas : Amérique, Euro. & M-East : Europe et Moyen Orient, Africa : Afrique, India / Western Asia : Inde/ Asie de l'Ouest, South-East Asia & Pacific : Asie du Sud Est et Pacifique.

Les *Anophèles* se dispersent peu d'un point de vue géographique. Chaque continent héberge sa propre biodiversité anophélienne. Ainsi en Afrique, les espèces du complexe *Anopheles gambiae* et *Anopheles funestus* sont les vecteurs majoritaires (3).

Bien qu'assez stable, il existe tout de même une évolution des populations d'*Anophèles*. Celle-ci pourrait être corrélée en partie à l'évolution climatique et aux transports maritimes accélérés du XXI^{ème} siècle ainsi qu'aux modifications comportementales (évolution trophique) observées chez certaines espèces. Par exemple en 2012, *Anopheles stephensi*, d'origine asiatique a été signalé pour la première fois sur le continent Africain où elle a depuis commencé son implantation. Étant un bon vecteur pour le paludisme, l'implantation de cette espèce, représenterait environ 126 millions de nouveaux cas de paludisme chez l'homme d'après les projections d'adaptation d'*Anopheles stephensi* (3).

Dans de nombreux pays d'endémie palustre, la transmission du paludisme se produit majoritairement dans une partie des régions du pays concerné. Ceci s'explique par la dépendance du parasite à son vecteur et à son écosystème. De plus, ce vecteur est particulièrement susceptible aux conditions géo-climatiques qui peuvent varier au cours des années, remodelant ainsi sa distribution dans l'espace et le temps. La transmission dépend des variations climatiques annuelles qui vont influencer sur l'abondance et la survie des moustiques, tels que le régime des précipitations, la température et l'humidité. La transmission n'est pas toujours saisonnière. Elle peut être pérenne avec un pic pendant ou juste après la saison des pluies (4). Généralement les régions proches de l'équateur sont en proie à une transmission plus intense du paludisme. En effet, *Anophèles* n'apprécie guère les températures basses, et est rarement retrouvé, voir absent à très haute altitude > 1500 mètres en Afrique. *Anophèle sp.* tolère peu les conditions sèches et dépend donc des conditions locales.

Toutes ces conditions dressent des barrières naturelles et dictent la répartition géographique mondiale des vecteurs et en finalité celle du paludisme.

Dans certaines régions tempérées le paludisme pourrait réémerger car des anophèles compatibles avec le vecteur y sont présents comme en Europe de l'Ouest et aux Etats-Unis.

Evolution vectorielle :

Concernant les espèces anthropophiles, le pic d'activité à la recherche d'un repas sanguin se situe sur la période nocturne. Les zones rurales possèdent un risque de transmission plus élevé. Les anophèles femelles sont les seules à effectuer un repas sanguin chez l'homme (5).

Mais des changements de comportement des vecteurs ont été observés récemment. Ainsi, alors que le pic d'agressivité des anophèles est généralement observé en milieu de nuit, des décalages d'activité au crépuscule ou à l'aube ont été rapportés (5). Elles correspondent à un moment où l'homme n'est pas protégé par la moustiquaire et les répulsifs intra-domiciliaires. On observe également une augmentation des anophèles urbains, diurnes et piquant à l'extérieur (5).

On note aussi une augmentation de la résistance du vecteur aux insecticides ces dernières années, alors que ceux-ci avaient participé au succès du contrôle du paludisme notamment aux Etats-Unis (5).

Les compétences vectorielles dans le paludisme sont le fruit d'une évolution étroite et constante entre le moustique et les autres membres évolutifs de la maladie, à savoir l'homme et son environnement.

Il semblerait ainsi que *Plasmodium sp* soit capable d'induire une pression de sélection à son avantage sur *Anophele sp* en allongeant sa longévité, en stimulant un appétit préférentiel pour l'homme comparé aux espèces animales, en développant un système immunitaire performant permettant son échappement à une réponse immunitaire anti plasmodiale chez l'homme (6) (7) (8).

1.1.3 Répartition des différentes espèces de *Plasmodium*

Cinq espèces de *Plasmodium* sont connues à ce jour comme responsables de paludisme chez l'homme. On retrouve *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* (complex *curtisi* et complex *wallikeri*), *Plasmodium malariae*, et *Plasmodium knowlesi*.

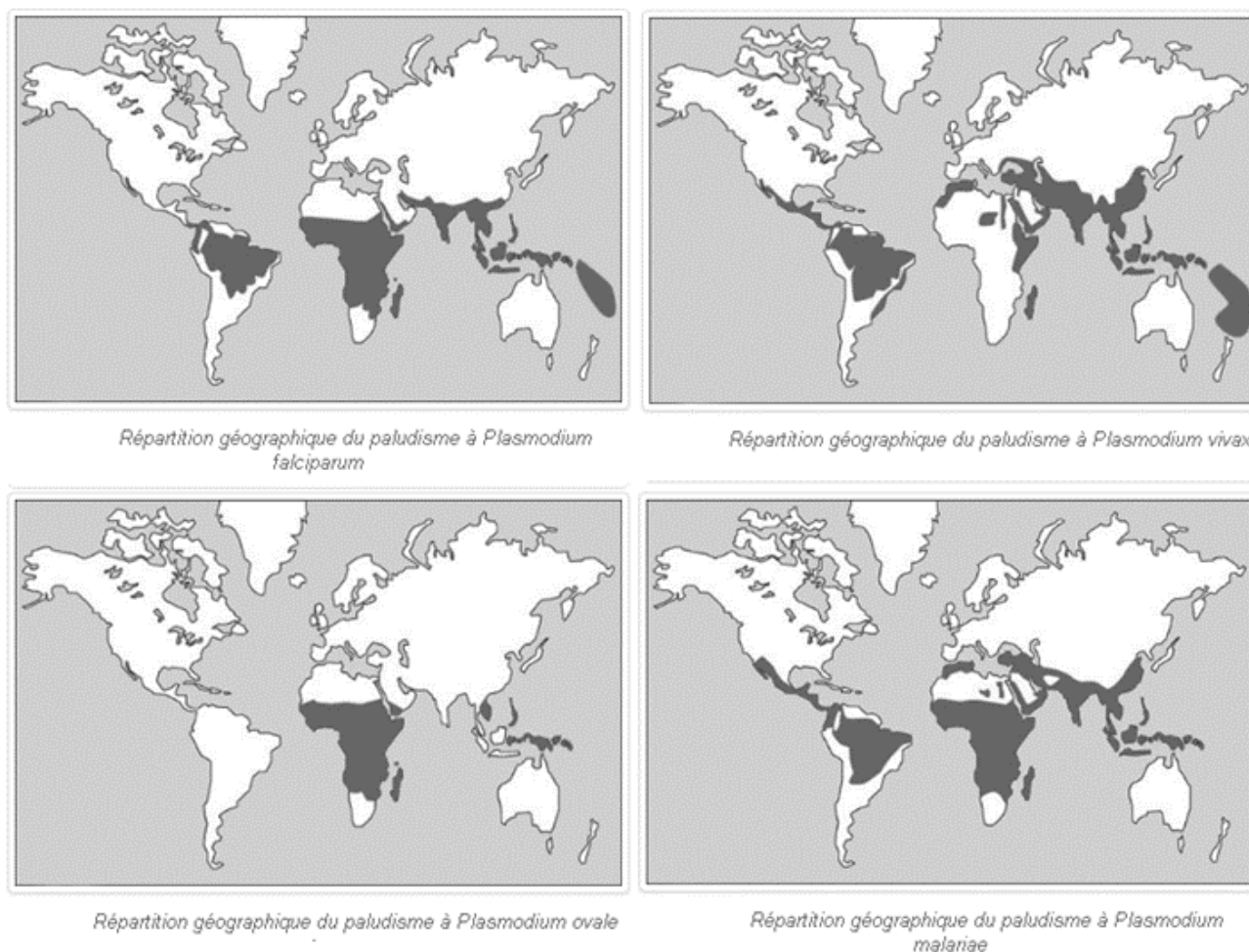


Figure 3 : Aires de répartition de *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* (2016) (9)

Ces espèces diffèrent principalement par leurs vecteurs, les critères de diagnostic cliniques, biologiques, leur capacité de reviviscence, leur capacité à développer des résistances aux antipaludéens et par leur répartition géographique bien qu'elles possèdent des territoires en communs (Figure 3) (9).

Géographiquement :

- *Plasmodium falciparum* est une espèce potentiellement mortelle. Elle est dominante en Afrique mais est également présente dans les zones tropicales d'Amérique Latine et d'Asie.
- *Plasmodium vivax* co-habite avec *Plasmodium falciparum* dans de nombreuses parties du monde, et est présent dans certaines régions tempérées. On le retrouve en Amérique Latine et Centrale, en Asie. En revanche sur le continent Africain elle se cantonne essentiellement à l'Afrique de l'Est et de l'Ouest
- *Plasmodium ovale* est principalement retrouvée en Afrique de l'Ouest et subsaharienne.
- *Plasmodium malariae* a une distribution mondiale très inégale comprenant l'Amérique du Sud, l'Asie et l'Afrique. L'infection à *Plasmodium malariae* est moins fréquente que *P. falciparum*. Elle possède une très faible mortalité mais peut entraîner des rechutes jusqu'à 20 ans après la primo infection.
- *Plasmodium knowlesi* a été reconnu assez récemment comme la 5^{ème} espèce de *Plasmodium* pathogène pour l'homme (11) (12). Il a été rapporté pour la première fois en 1927 chez une espèce de macaque *Macaca fascicularis* endémique de l'Asie du Sud-Est. Puis il a fallu attendre 1965 pour que soit rapportée la première infection avérée chez l'homme (10). L'utilisation des outils de biologie moléculaire (polymerase chain reaction (PCR)) a permis de mettre en évidence sa part importante dans les cas de paludisme dans cette zone du Monde. *Plasmodium knowlesi* est endémique à cette partie du monde et notamment en Malaisie et à Bornéo avec quelques cas d'importations rapportés dans les pays tempérés liés au tourisme (Figure 4) (11).



Figure 4 : Carte du nombre de cas de paludisme à *Plasmodium knowlesi* en 2014 en Asie de l'Est (11)

1.1.4 Cycle du parasite

Plasmodium est un protozoaire de l'embranchement des *Apicomplexa*. Le cycle de développement est dit dixène, avec nécessité de deux hôtes. Ainsi on diffère la phase asexuée et la phase sexuée (Figure 5) (13).

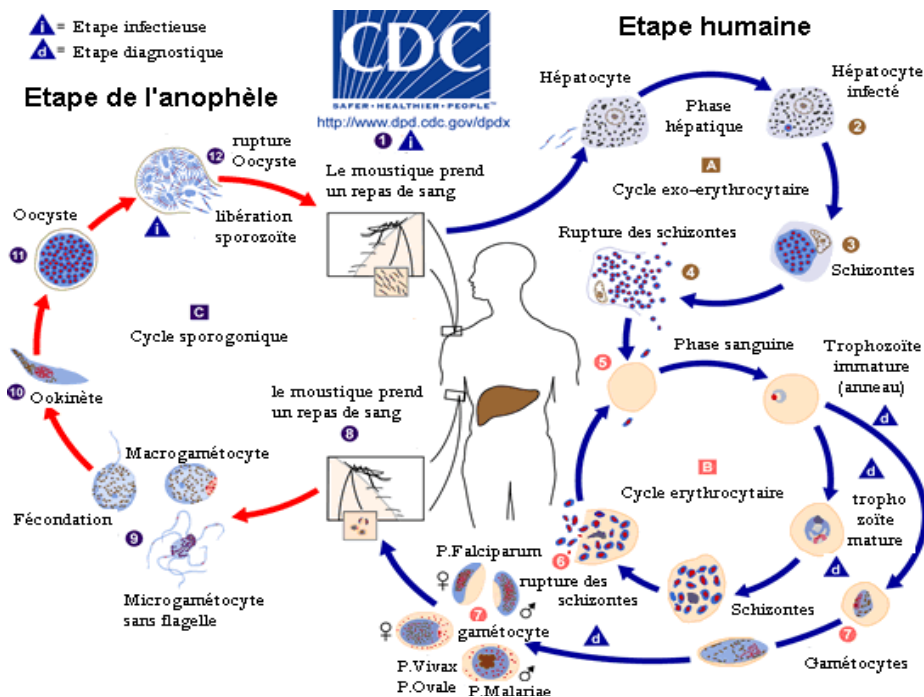


Figure 5 : Schéma du cycle parasitaire de *Plasmodium sp* (13)

- **La phase asexuée** se déroule chez l'homme. Il constitue l'hôte intermédiaire dans le cycle, servant de réservoir au parasite. Elle se déroule en plusieurs phases.

Phase primaire : Elle est cliniquement asymptomatique. Lors d'un repas sanguin, le moustique infecté injecte des sporozoïtes qui atteignent rapidement les hépatocytes humains. Le parasite s'y développe en 5 à 8 jours jusqu'au stade schizonte. Ces schizontes hépatocytaires en se rompant libèrent des mérozoïtes qui atteignent la circulation sanguine. Chez *P. vivax* et *P. ovale* certains parasites peuvent rester dans le foie sous forme dormante aussi appelées hypnozoïtes durant des semaines, voire des mois ou des années (14).

Phase secondaire : elle marque le début de la phase cliniquement symptomatique. Chez *P. falciparum*, les mérozoïtes libérés vont aller infecter les érythrocytes. Les parasites s'y développent en 48h en moyenne, progressant par les stades ring (0-24h), trophozoïte (24-36h) et schizonte (36-48h), jusqu'à libérer de nouveaux mérozoïtes. On observe rapidement une augmentation de la parasitémie par cycle de l'ordre à 6 à 20 fois la parasitémie précédente (15). Dans le même temps les premiers signes cliniques apparaissent, dont la fièvre synchronisée avec l'éclatement des schizontes (15).

La reproduction de ce cycle permet d'entretenir l'infection (Figure 6) (15).

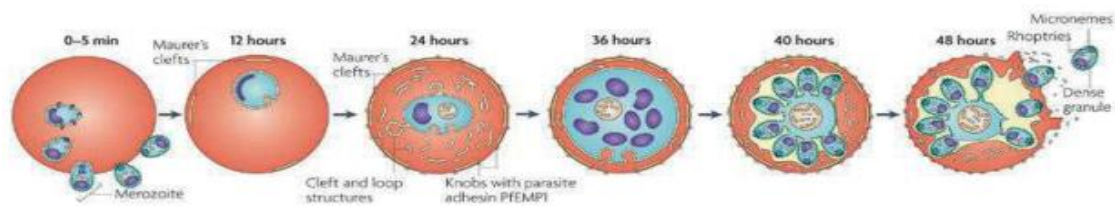


Figure 6 : Cycle plasmodial érythrocytaire chez *Plasmodium falciparum* (15)

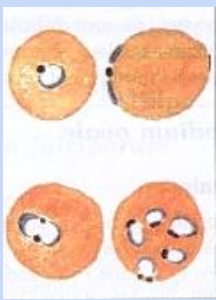


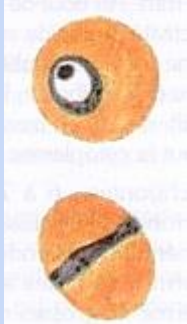
Parfois certains mérozoïtes lors de l'infection d'un nouvel érythrocyte, prennent un autre chemin de différenciation conduisant à la production d'un gamétocyte mâle ou femelle (9 à 11 jours pour *P. falciparum*). Puis lors d'un nouveau repas sanguin l'Anophèle va prélever ces gamétocytes : c'est chez le moustique que va se dérouler le reste du cycle qui correspond à la phase sexuée.

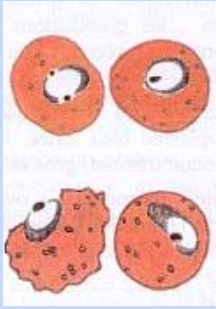



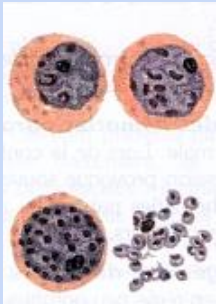



- **La phase sexuée** a lieu chez l'anophèle femelle qui constitue l'hôte définitif. Les gamétocytes sont incapables de se féconder chez l'homme. Ils ont besoin de l'anophèle pour produire la reproduction sexuée par fécondation des gamétocytes mâles et femelles dans le tractus digestif de l'anophèle. La fécondation va permettre la production d'un oocyste qui après maturation et éclatement va produire de l'ordre de 20 000 sporozoïtes. Ces derniers iront coloniser les glandes salivaires du moustique et pourront être transmis à l'homme lors d'un futur repas sanguin du moustique.





1.1.5 Morphologie parasitaire intra érythrocytaire en microscopie optique

Au cours de son cycle parasitaire intra-érythrocytaire, le parasite passe par plusieurs étapes distinctes morphologiquement et fonctionnellement. Elle varie également selon les espèces. Les variations morphologiques visibles par microscopie optique après coloration May Grunwald Giemsa (MGG) sont résumées dans le tableau 1 avec les représentations schématiques associées afin d'en faciliter l'interprétation. La caractérisation de ces différents stades est un outil précieux dans le diagnostic microbiologique du paludisme.

Tableau 1 : Reconnaissance des différents stades et espèces de *Plasmodium sp* d'intérêt clinique en médecine humaine

	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. ovale</i>	<i>P. malariae</i>
Parasitémie	De faible à 10%	Vers 2%	Vers 2%	< 2%
Taille hématies parasitées par rapport aux hématies non parasitées	Identique	Plus grandes Déformés irrégulièrement	Plus grandes Forme ovale ou frangée	Plus petites
Pluri-parasitisme	Fréquent	Absent	Absent	Absent
Trophozoïte (forme jeune : en bague)	En anneau cytoplasmique mince (bague à chaton) ou en virgule. Anneau en 2 parties si 2 petits noyaux. 1 ou 2 petits noyaux noirs Forme marginée du trophozoïte en périphérie d'hématie cas de traitement	Anneau cytoplasmique épais, parfois diffus Gros noyau unique Coloration saumonée de l'hématie	Anneau cytoplasmique épais bleu foncé Gros noyau rouge Granulation de Schüffner déjà présente à ce stade	Anneau cytoplasmique épais bleu foncé Gros noyau Pigment jaunâtre Grain de pigment brun noir
				

Trophozoïte (forme âgée) avec apparition des pigments	Forme en bague élargie avec anneau plus épais	Corps amoeboïde cytoplasme digité ou fragmenté + gros noyaux ± déformés Fins pigments noirs/verts	Épaississement et déformation de l'anneau Gros noyau rouge très net et compact	Forme en bague très épaisse ou en drapeau Pigments noirs en masse grossière concentrés sur les structures parasitaires
				
Pigments : correspond à une prise de coloration par l'éosine Apparaît généralement au stade trophozoïte âgé sauf chez <i>P. Ovale</i>	Tache de Maurer (tache rouge sombre en coup d'angle dans le cytoplasme érythrocytaire)	Granulations de Schüffner brunâtres à la surface de l'hématie occupant le volume non occupé par le parasite	Granulations de Schüffner à la surface de l'hématie (granulations volumineuses)	Pigments noirs en masse grossière concentrés sur les structures parasitaires
Schizonte (corps en rosace)	Petit (3-6µm), compact 12-30 mérozoïtes en amas Pigment : une seule masse sombre. <i>Leur présence est un signe de gravité</i>	Volumineux (10-14µm), 12-24 mérozoïtes, Pigments noirs fins diffusés. Masses rouges chromatiniennes	Taille moyenne (10µm), 4-12 Noyaux volumineux Gros pigments noirs concentrés	Petit (5-6µm), 6-12 Gros pigments noirs concentrés avec les noyaux autour <i>Aspect de marguerite</i>
				

Gamétocyte	<p>Forme caractéristique en banane (10µm), Amas central de granulations nucléaires rouges et de pigments noirs</p>	<p>Arrondi (10-12µm), difficile à discerner des trophozoïtes. Cytoplasme bleu pâle ou mauve Noyaux rejetés en périphérie Pigments fins noirs dispersés</p>	<p>Arrondi (7-8µm), Cytoplasme bleu pâle ou mauve, Chromatine : une seule tache bien définie Pigments : dispersé en bâtonnets</p>	<p>Arrondi (5-6µm), Cytoplasme bleu pâle ou mauve, Pigments noirs en grains volumineux et abondants</p>
				

La reconnaissance des différentes formes par espèce bien que difficile d'apprentissage est importante dans le diagnostic biologique du paludisme. Dans un contexte d'étude de *Plasmodium in vitro*, elle permet également d'étudier les différents stades au cours des cultures cellulaires.

1.1.6 Données épidémiologiques du paludisme

1.1.6.1 Evolution du paludisme à *Plasmodium falciparum* au niveau mondial

En 2020, on estime que la moitié de la population mondiale a été exposée au risque de paludisme. En 2019 dans le Monde, le nombre de cas de paludisme a été estimé à 229 millions, au travers de 87 pays d'endémie palustre (14).

Au niveau mondial, l'incidence du paludisme a reculé entre 2010 et 2019, passant de 71 cas pour 1 000 habitants exposés au risque de paludisme à 57 pour 1 000. Néanmoins, la progression de la baisse de l'incidence a considérablement ralenti entre 2014 et 2019, puisque l'incidence reste similaire de 2014 à 2019 (14).

La répartition du nombre de cas est inégale dans le Monde avec 29 pays d'Afrique et d'Inde qui ont concentré 95 % du nombre total de cas de paludisme dans le monde. Le Nigéria (27 %), la République démocratique du Congo (12 %), l'Ouganda (5 %), le Mozambique (4 %) et le Niger (3 %) ont enregistré à eux seuls, près de 51 % des cas (14).

Le nombre de pays où le paludisme était endémique en 2000 et qui ont rapporté moins de 10 000 cas a augmenté, passant de 26 en 2000 à 46 en 2019. Au cours de la même période, les pays comptant moins de 100 cas de paludisme indigène sont passés de 6 à 27. Entre 2019 et 2020, 21 pays ont rapporté 3 années consécutives sans cas de paludisme autochtone. Dix de ces pays ont ainsi été certifiés "malaria free" par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (14).

Le nombre de décès dus au paludisme a été estimé à 585 000 en 2010, 405 000 en 2018 et 409 000 en 2019. En 2019, les enfants de moins de 5 ans ont représenté 67% des décès associés au paludisme dans le monde, ils constituent et restent la partie de la population la plus vulnérable à cette maladie (14).

Environ 95 % des décès sont répartis dans 31 pays avec une concentration des décès à 51 % dans 6 pays dont le Nigeria (23%), la République démocratique du Congo (11%), la Tanzanie (5%), le Burkina Faso (4%), le Mozambique (4%) le Niger (4%). La progression de la baisse de la mortalité liée au paludisme a ralenti depuis 2016 (14).

Toutefois, selon les estimations, 1,5 milliards de cas de paludisme et 7,6 millions de décès associés ont été évités dans le monde entre 2000 et 2019 grâce aux mesures mises en œuvre telles que la distribution de moustiquaires imprégnées et le nouvel arsenal thérapeutique (14).

1.1.6.2 Évolution du paludisme au niveau de la France (Données épidémiologiques pour la France (rapport CNR 2019))

En 2019, en métropole, un total de 2 830 cas de paludisme a été déclaré au Centre national de référence (CNR) du paludisme par les correspondants. Néanmoins le CNR estime que le nombre de cas de paludisme d'importation est d'environ 5 570 cas pour l'ensemble de la France métropolitaine. Cinq cas présumés autochtones (faisant suite à une greffe, aéroportuaire ou cryptique) ont été confirmés par le CNR (16).

L'espèce majoritaire reste *P. falciparum* avec 88,5% des cas. Les pays de contamination sont issus majoritairement de l'Afrique subsaharienne (97,2%). Les cas surviennent majoritairement chez des sujets d'origine Africaine (86,4%), résidant en France ou arrivant d'Afrique.

Le nombre et la proportion des formes graves a été de 406 cas soit 15,1% des accès palustres. La létalité du paludisme en France a été de 0,35% pour 2019 soit 10 décès. Concernant les accès graves, la mortalité est de 2,5%.

Le traitement par artésunate intraveineux a été le traitement le plus prescrit pour la prise en charge des accès graves à *P. falciparum* (81,6% des cas) (16).

1.1.7 Diagnostic biologique

Pendant longtemps la microscopie a été la méthode de référence pour la détection du paludisme dans un délai court. En France, les dernières recommandations préconisent l'utilisation en première ligne du diagnostic par frottis mince associé à une technique de haute sensibilité telle que la goutte épaisse ou le QBC (quantitative buffy coat) ou une technique de biologie moléculaire rapide permettant un rendu des résultats en moins de 2 heures (Figure 7) (17). Les différents outils diagnostiques sont présentés dans les parties suivantes.

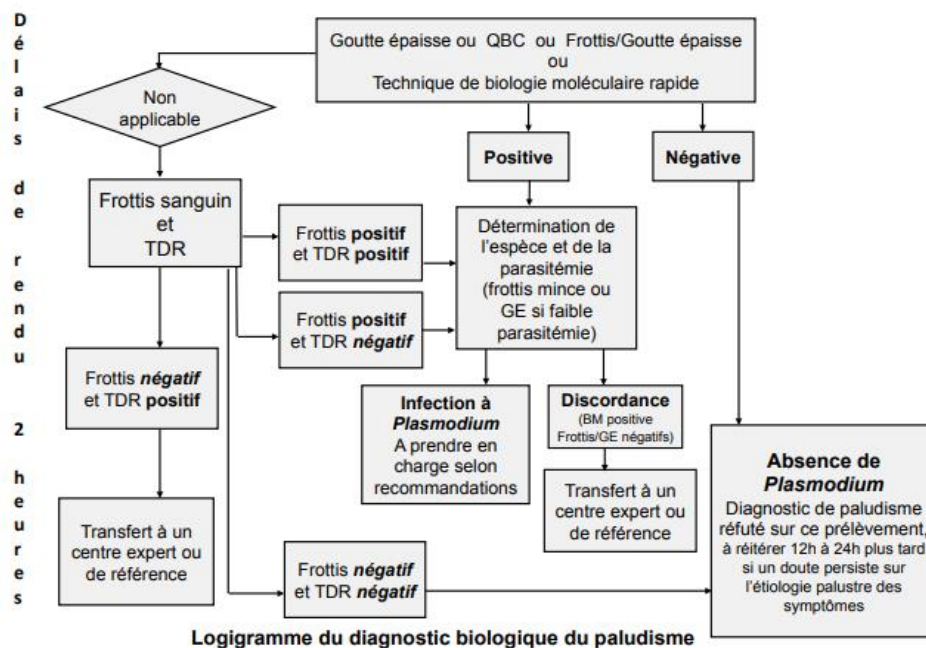


Figure 7 : Logigramme du diagnostic biologique du paludisme (17)

A) Microscopie optique :

Elle nécessite un personnel formé et expérimenté. Elle permet l'obtention de nombreuses informations par 2 procédés après une coloration (May Grunwald Giemsa) MGG.

- Le frottis mince : Il permet d'établir le diagnostic d'espèce, de quantifier la parasitémie (en pourcentage des hématies parasitées) et de suivre la décroissance parasitaire. Le frottis possède une sensibilité permettant de détecter une parasitémie de 200 hématies parasitées par μL de sang. Il constitue un examen indispensable dans la prise en charge et le suivi des accès palustres.

- La goutte épaisse : Il s'agit d'un examen très sensible et est capable de détecter une parasitémie jusqu'à 10 à 20 hématies parasitées par μL de sang (18). Il n'est pas utilisable pour déterminer l'espèce.

- **QBC Malaria® :**

Le « quantitativ buffy coat » (QBC) Malaria® repose sur l'observation microscopique après coloration à l'acridine orange de l'ADN des parasites intra-érythrocytaires en tube capillaire. Elle figure encore dans les recommandations grâce à sa sensibilité équivalente à la goutte épaisse, mais en pratique elle n'est presque plus utilisée car cette technique demande des équipements très spécifiques et coûteux.

B) Diagnostic par biologie moléculaire

Historiquement la PCR est un outil avec une haute sensibilité et spécificité capable d'identifier des espèces morphologiquement proches. Pendant longtemps elle n'a pas été utilisée dans le diagnostic rapide en raison des délais de rendu de résultats supérieurs à 2 heures. L'émergence de la PCR rapide en milieux clos par technologie « loop-mediated isothermal amplification » (LAMP) a permis son introduction dans les outils de première intention du diagnostic rapide de paludisme en 2014 (19) (20). Elle ne permet pas l'obtention d'une parasitémie. Elle doit donc être obligatoirement associée à un frottis sanguin en cas de résultat positif (19).

C) Recherche d'antigènes par TDR - technique immunochromatographique :

Les tests de diagnostic rapide (TDR) par technique immunochromatographique reposent sur la détection d'antigènes du *Plasmodium sp* par anticorps monoclonaux dirigés sur une bandelette de nitrocellulose. Le résultat est rapide (moins de 15 minutes) par lecture visuelle.

- L'Histidine-rich protéine-2 (HRP2) est spécifique du *P. falciparum*. Elle peut persister jusqu'à 28 jours après guérison pouvant induire des « faux positifs » et rend son utilisation peu utile dans le suivi (21). Il existe également des délétions de gènes codant pour la protéine HRP2 qui peuvent conduire à des faux négatifs (22) (23). Les tests TDR doivent obligatoirement rechercher cet antigène. La reconnaissance de HRP2 dans le test antigénique possède une sensibilité de l'ordre de 95% et une spécificité de l'ordre de 95%.

- La pan-lactate déshydrogénase plasmodiale pan-p(LDH) est commune aux différentes espèces de *Plasmodium sp*. Certains TDR utilisent une LDH (pv-pLDH) spécifique de *Plasmodium vivax* permettant la différenciation avec les 4 autres espèces. La LDH a une clairance rapide après un traitement du paludisme. Sa sensibilité pour *Plasmodium falciparum* est de 93% et sa spécificité est de 98%.

- La pan-aldolase plasmodiale est commune aux différentes espèces de *Plasmodium*. Il existe également une Pv-aldolase, spécifique de *Plasmodium.vivax*.

1.1.8 Prise en charge du paludisme à *Plasmodium falciparum*

Vers le XVII^{ème} siècle, des préparations sous forme de poudre d'écorce issue de la plante *Cinchona officinalis* contenant de la quinine ont été introduites en Europe et ont commencé à constituer les premiers traitements efficaces décrits. Toutefois l'obtention naturelle de cette poudre issue d'Amérique du Sud se faisait à une échelle réduite et coûteuse.

Au cours des deux siècles suivants elle a vu son processus d'obtention industrialisé par extraction et purification afin d'en augmenter l'efficacité et d'en diminuer les effets indésirables importants. Néanmoins elle gardait une toxicité importante, mais continuait à être employée faute d'alternative thérapeutique connue. En 1945 l'isolement des dérivés synthétiques de la quinine et leurs productions massives à bas coût a permis de disposer d'un traitement efficace, peu toxique et bon marché. La chloroquine est la principale chef de file de ces dérivés et permet aussi bien le traitement curatif des accès palustres que la prévention des accès par chimio prophylaxie. Elle a permis une nette amélioration du contrôle de l'endémie palustre dans les années 1950-1970. Elle a servi de base à la conception de nombreuses autres molécules plus ou moins spécialisées dans les nombreuses indications palustres.

1.1.8.1 Molécules anti-palustres disponibles

La seconde moitié du XX^{ème} siècle a été une période assez faste dans la découverte de nouvelles familles de molécules anti-plasmodiales. Aujourd'hui il existe plusieurs familles de molécules actives (24), agissant par différents mécanismes d'actions et aux caractéristiques pharmacodynamiques variées (Tableau 2). Certaines molécules plus sûres d'emplois et à l'efficacité importante prennent une place majeure dans la stratégie anti parasitaire. (24)

Tableau 2 : Principales molécules anti-palustres employées et mécanisme d'action.

Familles de molécules	Amino-4-quinoléines	Amino-alcools	Sesqui terpènes	Anti foliques	Antifoliniques	Naphto quinone	Antibiotique : Cycline
Molécules	Chloroquine Amodiaquine Pipéraquline Pyronaridine	Méfloquine Halofantrine Luméfántrine Quinine et dérivés	Artéméther Artésunate Artéminol(= dihydroartémisinine)	Sulfadoxine	Pyriméthamine Proguanil	Atovaquone	Doxycycline
Site d'action	Vacuole digestive		Vacuole digestive	Cytoplasme		Mitochondrie	Ribosome 70S
Délai d'action schizonticide	Action Rapide		Action Rapide	Action Lente (<i>antimétabolite</i>)		Action Lente	Action Lente
Mécanisme(s) d'action	Accumulation dans la vacuole digestive du parasite. Augmentation du pH vacuolaire. Inhibition de la polymérisation de la ferriprotoporphyrine IX en pigment insoluble (hémozoïne)		Production de radicaux libres après interaction avec l'hème	Inhibition compétitive des enzymes de la voie de synthèse de l'acide folique Dihydroptéroate et Dihydrofolate synthétase/réductase DHPS DHFR		Inhibition de la Dihydroorotate deshydrogénase (DHOD) Altération du transport des électrons au niveau du cytochrome bc1	Inhibition fonction apicoplastique

Légende : DHPS : dihydroptéroate synthase, DHFR : dihydrofolate réductase

- Les amino-4-quinoléines et amino-alcools sont des bases faibles, qui s'accumulent dans la vacuole digestive du parasite et diminuent son acidité. Les dérivés quinoléiques inhibent la détoxification de l'hème via la formation d'hémozoïne.

- Les dérivés de l'artémisinine sont des endopéroxydes qui se lient à l'hème dans la vacuole digestive du parasite. Cette interaction provoque la libération de radicaux libres toxiques.

- Les antifoliques et les antifoliniques inhibent la voie métabolique de synthèse de l'acide folique du parasite, ce qui conduit à perturbation de la biosynthèse des pyrimidines.

- Les naphthoquinones sont inhibitrices de la biosynthèse des pyrimidines. Dans la mitochondrie, elles bloquent la chaîne de transfert des électrons au niveau de son enzyme clé, la dihydro-orotate réductase, ainsi que le complexe cytochrome bc1 en se substituant à l'ubiquinone.

De nombreuses molécules anti-palustres sont utilisées en association, afin d'obtenir une synergie d'action et de limiter le risque de résistance. Parmi ces associations on retrouve notamment les ACT pour artemisinin-based combination therapy :

- ACT : luméfántrine / artéméthér : Riamet[®]
- ACT : pipéraqúine / artéminol : Eurartésim[®]
- sulfadoxine / pyriméthamine : Fansidar[®]
- chloroquine / proguanil : Savarine[®]
- proguanil / atovaquone : Malarone[®]

1.1.8.2 Prise en charge thérapeutique du paludisme à *Plasmodium falciparum*.

La situation de terrain de la lutte contre le paludisme comprend 2 situations :

- ❖ La chimioprophylaxie (CP) : destinée aux populations voyageant des zones non-endémiques vers les zones endémiques. Elle se définit comme l'administration d'un traitement préventif dont la concentration sanguine est suffisante pour inhiber le développement du parasite au stade pré-érythrocytaire ou érythrocytaire pendant la période à risque (25).
- ❖ Le traitement curatif des accès palustres.

Dans ces 2 situations, la lutte antiparasitaire s'appuie largement sur les molécules anti-plasmodiales dont les emplois sont le reflet de leur date de découverte, de l'étude de leur

efficacité et des résistances en cours. Leur emploi est le fruit d'une réévaluation permanente en fonction de l'état de l'écosystème palustre actuel.

Stratégie de prise en charge curative du Paludisme à *Plasmodium falciparum* :

Lors de la période prodromique qui inclut l'invasion et l'incubation, l'apparition de signes cliniques peut être assez discrète et aspécifique. Parmi les signes, on retrouve principalement la fièvre. Elle peut être accompagnée de céphalées et de signes digestifs non spécifiques.

Le choix et les modalités de traitement dépendent de l'espèce, de la présence de signes de gravité, de l'existence d'une éventuelle contre-indication aux médicaments, de la présence de vomissements empêchant une prise de médicaments *per os*.

Dans la prise en charge curative d'accès palustre à *Plasmodium falciparum*, on distingue 2 situations cliniques d'intérêt. Le traitement de l'accès grave et de l'accès simple comportent chacun leurs spécificités.

- **Paludisme grave à *Plasmodium falciparum* de l'adulte, la femme enceinte et l'enfant :**

L'accès grave possède initialement une symptomatologie qui s'apparente à celle d'un accès palustre simple et qui va évoluer vers une forme plus sévère avec des défaillances d'organes et qui définissent des critères cliniques et biologiques de gravité.

La prise en charge du paludisme grave est une urgence diagnostique et thérapeutique. Elle implique une hospitalisation en réanimation et la mise en place d'un traitement curatif immédiat, dès l'instant où le diagnostic de paludisme est posé. En effet, le passage d'une forme simple à une forme grave peut se faire en quelques heures pour *P. falciparum*. On sait que les manifestations cérébrales et l'atteinte rénale sont les plus fréquentes dans les 48 premières heures. Le neuro-paludisme consiste en une atteinte du système nerveux central qui s'associe à une défaillance multi-viscérale avec \pm syndrome de détresse respiratoire aiguë \pm collapsus \pm insuffisance rénale aiguë. En la présence d'au moins 1 signe de gravité ci-dessous, l'accès palustre est défini comme grave (Tableau 3).

Tableau 3 : Critères de gravité du paludisme grave issus de réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP) de 2007 actualisés en 2017 (17).

Pronostic péjoratif	Critères cliniques ou biologiques	Fréquence
+++	Toute défaillance neurologique incluant : · obnubilation, confusion, somnolence, prostration, convulsion(s) · coma avec score de Glasgow < 11	+++
+++	Toute défaillance respiratoire incluant : · si VM ou VNI : PaO ₂ /FIO < 300 mmHg · si non ventilé : PaO ₂ < 60 mmHg et/ou SpO ₂ < 92 % en air ambiant et/ou FR > 30/min · signes radiologiques : images interstitielles et/ou alvéolaires	+
+++	Toute défaillance cardiocirculatoire incluant : · pression artérielle systolique < 80 mmHg et/ou présence de signes périphériques d'insuffisance circulatoire · nécessité de drogues vasopressives et lactate > 2 mmol/L	++
+ ■	Hémorragie (définition clinique)	+
+	Ictère : clinique ou bilirubine totale > 50 µmol/L	+++
+	Hémoglobinurie macroscopique	+
+	Anémie profonde : hémoglobine < 7 g/dL, hématocrite < 20 %	+
+	Hypoglycémie : glycémie < 2,2 mmol/L	+
+++	Acidose : · bicarbonates plasmatiques < 15 mmol/L · ou acidémie avec pH < 7,35 (surveillance rapprochée dès que bicarbonates < 18 mmol/L)	++
+++	Hyperlactatémie : > 2 mmol/l <i>a fortiori</i> > 5 mmol/L	++
+	Hyperparasitémie : dès que parasitémie > 4 %	+++
++	Insuffisance rénale : · créatininémie > 265 µmol/L ou urée sanguine > 20 mmol/L	+++

Légende : VM : Ventilation mécanique, VNI : ventilation non invasive, FR fréquence respiratoire.

Une partie des critères sont issus des actes biologiques, c'est pourquoi la biologie tient une place importante dans le diagnostic.

Le traitement curatif du paludisme grave repose désormais chez l'adulte et l'enfant sur l'artésunate par voie intraveineuse (IV) qui a supplanté la quinine IV en termes d'efficacité. L'artésunate est disponible sous autorisation temporaire d'utilisation (ATU). Cette autorisation est nominative et à confirmation différée. Ce statut particulier lui permet d'être commandé à l'avance et de le prépositionner à la pharmacie ou en réanimation, afin qu'il soit rapidement disponible.

Schémas thérapeutiques pour l'artésunate IV :

- **Chez l'adulte, la femme enceinte et l'enfant > 20kg :**

En perfusion IV de 2,4 mg/kg à H0, H12, H24. Le traitement IV est à poursuivre au minimum pendant 24 heures (3 doses), ou jusqu'à amendement du/des critère(s) de gravité. Après ces 24h lorsqu'une prise orale est possible, un relais *per os* est fait par un des traitements de 1^{ère} intention du paludisme simple (arténimol/pipéraquline ou artéméther/luméfantine).

La posologie chez la femme enceinte est identique à celle de l'adulte. Le taux de mortalité dû au paludisme grave pendant la grossesse est de 50 % environ. Il est nettement plus élevé que chez les femmes non gravides. L'artésunate constitue le traitement de choix. En cas d'indisponibilité de ce médicament, selon les dernières recommandations de l'OMS, l'artéméther serait préférable à la quinine en fin de grossesse car la quinine est associée à un risque d'hypoglycémie de 50 %.

- **Chez l'enfant de ≤ 20kg :**

En perfusion IV de 3mg/kg à H0, H12, H24, puis lorsque le relais *per os* est possible, appliquer les mêmes modalités que celles préconisées pour l'adulte.

Si l'artésunate n'est pas disponible immédiatement au début du traitement, il faudra débiter le traitement par quinine IV. Lors de son administration, il faudra effectuer une surveillance electro-cardioscopique et glycémique.

Schéma thérapeutique de la quinine :

En perfusion IV à la dose de 20 mg de sel de quinine (sous forme de dichlorhydrate de quinine) à diluer en soluté salin isotonique à la dose de 10 ml/kg (dose de charge) à l'admission dans les 8 premières heures, puis 10 mg/kg toutes les 8h et ce pendant au moins 24h.

Une injection par voie IM à la même posologie est possible en cas d'impossibilité d'utilisation de la voie veineuse. De la même façon, après ces 24h lorsqu'une prise orale est possible, un relais *per os* par thérapies combinées de dérivés de l'artémisinine (ACT) est réalisable.

Relais :

Dès l'amélioration de l'état clinique du patient, un relais doit être entrepris dans la suite de la prise en charge du patient qu'elle soit ambulatoire ou à l'hôpital. Les ACT sont à préférer et sont les médicaments de 1^{ère} intention :

- Arténimol / Pipéraquline : à la posologie de 3 comprimés en 1 prise par jour à jeun pendant 3 jours consécutifs.
- Artéméther / Luméfántrine : 4 comprimés en 1 prise deux fois par jour pendant 3 jours. La posologie doit être ajustée en fonction du poids corporel ; 4 comprimés pour les adultes qui pèsent > 50 kg

On retrouve aussi l'association Atovaquone/Proguanil en 2nd intention : 4 comprimés en 1 prise pendant 3 jours et la quinine en 3^{ème} intention par voie per os 8mg/kg/8H pendant 7 jours.

● **Paludisme non compliqué à *Plasmodium falciparum***

L'accès palustre simple : il s'agit de pics fébriles réguliers avec des frissons, des céphalées, fatigue, nausées, vomissements, diarrhées et douleurs diffuses.

On distingue trois situations cliniques, à savoir le traitement de l'adulte, de la femme enceinte, et de l'enfant.

→ **Adulte en l'absence de vomissement :**

La prise en charge ambulatoire d'un paludisme non compliqué à *P. falciparum* est possible sous réserve de critères cliniques et biologiques précis et de la possibilité d'un suivi médical. (Figure 8) (17)

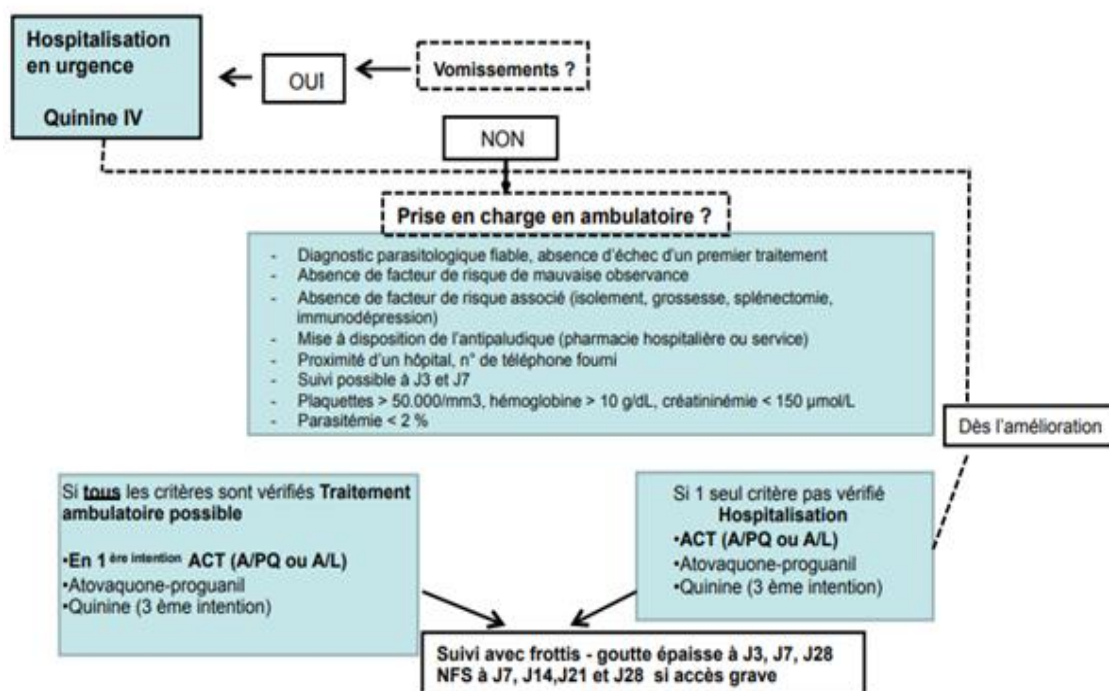


Figure 8 : Algorithme de décision chez l'adulte dans la prise en charge d'accès simple palustre issu de la société de pathologie infectieuse de langue française (SPILF) (17)

Le traitement doit être rapide car l'évolution vers une forme grave peut être rapide. On retrouve dans les recommandations françaises :

- 1^{ère} intention : artéméther/luméfántrine *per os* ou arténimol/pipéraqúine *per os*
- 2^{ème} intention : atovaquone proguanil *per os*
- 3^{ème} intention : quinine *per os*

Dans le cadre de la forme non compliquée à *P. falciparum*, en présence de vomissements ou de troubles digestifs importants pouvant altérer l'absorption du médicament, la quinine par voie IV constitue le traitement de référence. Elle est alors à administrer en perfusion IV lente et continue dans du sérum glucosé à 5%, elle est à arrêter dès l'arrêt des vomissements ou des troubles digestifs.

→ **Femme enceinte en l'absence de vomissement**

Chez la femme enceinte, le paludisme non compliqué à *P. falciparum* impose une hospitalisation. L'accès simple peut être traité par quinine *per os* ou l'atovaquone / proguanil *per os* lors du 1er trimestre. A partir du 2^{ème} trimestre, on préfère l'association artéméther / luméfántrine *per os*.

→ **Enfant en l'absence de vomissement**

Chez le jeune enfant, une hospitalisation initiale est recommandée pouvant faire suite à une prise en charge ambulatoire en cas de déroulement favorable de début de traitement avec amélioration de l'état clinique.

Le traitement de 1^{ère} intention chez l'enfant est constitué par l'usage d'ACT *per os*. L'atovaquone / proguanil *per os* et la méfloquine *per os* constituent des traitements de seconde intention (Figure 9) (17)

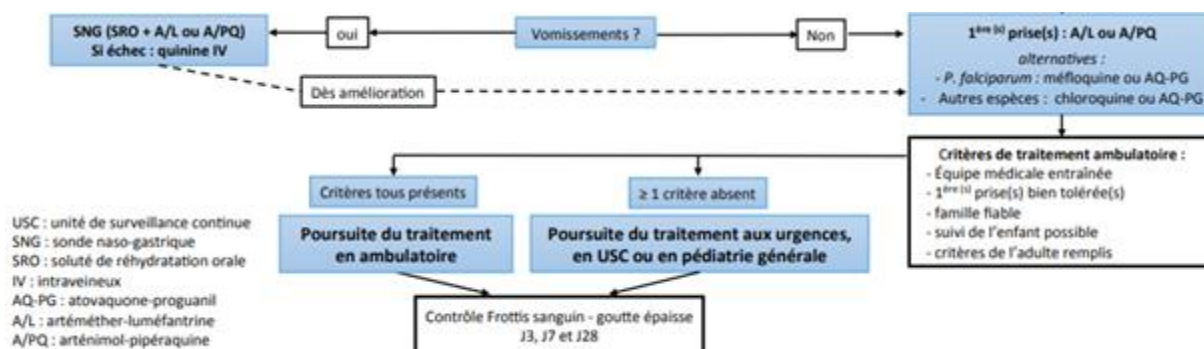


Figure 9 : Algorithme de décision chez l'enfant pour la prise en charge d'accès simple palustre issue de la société de pathologie infectieuse de langue française (17)

1.2 Place de la doxycycline dans la stratégie anti palustre

Les tétracyclines font partie de la famille des cyclines. Elles ont été découvertes au début des années 1940. Elles possèdent un large spectre d'action antibactérien, et constituent une classe médicamenteuse d'intérêt majeur inscrite à l'ordre des médicaments essentiels en médecine humaine par l'OMS.

Par la suite, l'efficacité de toute cette famille a été mise en évidence sur les protozoaires, ce qui avait conduit à son utilisation dès 1950 dans le traitement des accès palustres simples (26). On retrouve aussi un usage de la terramycine dans des accès palustres non compliqués au Mexique en 1952 et un usage de la tétracycline dans cette même indication en 1956 (27) (28).

La doxycycline inventée et développée cliniquement au début des années 1960 est un agent bactériostatique à large spectre, dérivé synthétiquement des tétracyclines naturelles produites par la bactérie *Streptomyces sp.* Disposant de molécules anti-palustres efficaces à cette époque, son emploi a été supplantée par d'autres familles d'antipaludiques conduisant à une baisse de son intérêt dans cette indication.

Dès 1970, rattrapé par l'émergence de résistances, la doxycycline se voit réintroduite en Asie du Sud-Est dans l'indication de chimioprophylaxie à *P. falciparum* en 1985 à la suite des études du Centres pour le contrôle et la prévention des maladies (CDC) en 1970 (29) (30). On trouve aussi un usage en prophylaxie dans les forces militaires françaises déployées en zone endémique.

1.2.1 Pharmacologie

La doxycycline est rapidement absorbée par voie *per os*. Sa liposolubilité importante est liée à sa structure chimique de formule brute $C_{22}H_{24}N_2O_8$ et de dénomination chimique UICPA (4S,4aR,5S,5aR,6R,12aS)-4-(diméthylamino)-3,5,10,12,12a-pentahydroxy-6-méthyl-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahydratétracène-2-carboxamide (Figure 10). Elle lui permet une très bonne pénétration tissulaire et intracellulaire.

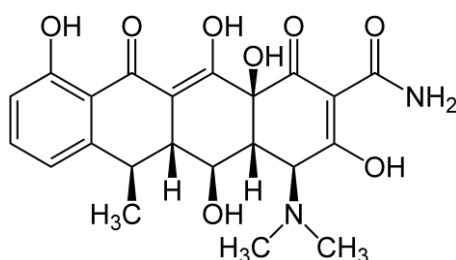


Figure 10 : Structure chimique doxycycline

Les données pharmacocinétiques de la doxycycline dans l'indication palustre sont résumées dans le tableau 4 (31).

Tableau 4 : Paramètres pharmacocinétiques de la doxycycline *in vivo* chez l'homme (31)

Paramètres pharmacocinétique doxycycline :	
Biodisponibilité	95%
Tmax (temps d'atteinte de la concentration maximale)	2-4h
Volume de distribution	1451 ml/kg
Liaison protéines plasmatiques	80-93%
Métabolisation	Absence
T1/2 (demi-vie élimination sérique)	3 jours
Élimination	Urines et selles
Concentration maximale sérique correspondante pour dose 100-200mg/j	6-8 µmol les 6 premières heures 1-2 µmol les 18 heures suivantes

Formulation galénique :

En médecine humaine en France, plusieurs formes galéniques sont compatibles pour un usage *per os* dont les comprimés secs 100, 50, 40 mg, comprimés pelliculés 100 et 50 mg, gélules 100 et 50 mg, poudre pour solution buvable 500 mg de doxycycline /1g de poudre. Elle existe aussi sous forme de solution injectable 100mg/5ml pour un usage IV. Dans d'autres pays on retrouve aussi des comprimés dosés à 200 mg de principe actif.

L'intérêt de la forme comprimé est qu'elle est facile d'usage, peu encombrante, stable, sécable pour un ajustement de la dose en fonction de l'indication et du poids du patient. Cependant, elle est associée à un risque significativement plus élevé de créer des effets indésirables gastro-intestinaux que les formes gélules et comprimés pelliculés (32) (33).

Depuis sa commercialisation, l'évolution chimique de la doxycycline a conduit à l'emploi de 2 dérivés. On retrouve la forme monohydrate et la forme sel d'hyclate qui ont toutes les deux l'avantage d'avoir une tolérance améliorée par rapport aux premières formes synthétisées (33) (34). Quelques différences mineures subsistent entre ces dérivés et concerne la tolérance gastro-intestinale. Il n'a pas été mis de différence d'efficacité entre les 2 formes, mais la forme monohydrate semblerait significativement mieux tolérée au niveau gastro-intestinal sur les traitements au long cours (33) (34).

Malgré cet avantage, c'est sous la forme hyclate que la doxycycline est majoritairement employée dans le monde. En effet cette dernière possède un coût nettement inférieur de 11\$ US/14 jours contre 65.79\$/14 jours pour la forme monohydrate malgré la sortie récente de sa forme générique (35).

1.2.2 Traitement curatif et chimio prophylactique, posologie, résistance, tolérance

En 1974, des études mettent en lumière un mécanisme d'action tardif de la doxycycline à la posologie de 100-200mg/j sur *Plasmodium sp.* Ce délai d'action avait conduit la communauté scientifique à exclure la doxycycline de l'arsenal des traitements d'urgence des accès graves. Par extension, elle était aussi peu utilisée dans les cas d'accès simples. En revanche elle est utilisée classiquement et fréquemment en chimioprophylaxie à travers le monde quelle que soit la région.

La montée de la résistance de *Plasmodium falciparum* à plusieurs molécules anti-palustres dont la chloroquine depuis 1960 et même plus récemment aux dérivés de l'artémisinine dans l'Asie du Sud-Est depuis une dizaine d'années a conduit à l'étude d'alternatives thérapeutiques.

Dans cet objectif, l'efficacité de la doxycycline en monothérapie et en association a été essentiellement réévaluée par la communauté scientifique dans le traitement des accès simples qui sont moins exigeants en termes de rapidité d'action.

A) Traitement curatif

a) En monothérapie

Daprès Rieckemann et al. et Colwell et al., dans le cas d'accès simple à *Plasmodium falciparum* chloroquino-résistant, l'emploi de la doxycycline *per os* à la posologie de 250 mg 4 fois par jours pendant 7 jours en monothérapie, montre des taux de guérison de 75 à 100% (36) (37). Les frottis sanguins montrent l'absence de formes asexuées et sexuées en moyenne entre 3.8 et 6 jours ; la fièvre disparaît entre 3.6 et 4 jours (35) (36) (37). Si l'on compare à la quinine *per os* seule, dans le même cas d'accès simple à *Plasmodium falciparum* chloroquinorésistant, les frottis sanguins devenaient négatifs en 2.6 jours, et la fièvre disparaissait entre 1.9 à 2.6 jours (38) (39). Encore une fois, la lenteur de son action rend son usage limité en monothérapie (35).

A noter qu'on retrouve dans la littérature des essais concernant l'exploitation d'un mécanisme d'action précoce de la doxycycline qui se produirait à des posologies plus importantes (600 mg/j en une administration) sans majoration des effets indésirables connus (40) (41). L'efficacité, la tolérance de cette posologie et les indications qui pourraient en découler sont en cours d'étude. Mais ces essais pourraient permettre d'étendre les indications de la doxycycline comme médicament anti palustre dans le traitement des accès simples.

b) En association

D'autres études se sont intéressées à son utilisation en association dans le cadre du traitement des accès simples à *Plasmodium falciparum*. Cette indication convient à la doxycycline qui possède des mécanismes d'action distincts des thérapies anti-plasmodiales usuelles. Le recours de la doxycycline en association avec un schizonticide rapide, permet de combler le manque de rapidité d'action de la doxycycline tout en assurant une association synergique des mécanismes d'actions des molécules employées. La doxycycline peut être utilisée comme molécule « de long cours » dans le cadre de l'association grâce à sa meilleure tolérance générale sur le long terme. Elle permet ainsi d'assurer l'élimination des parasites résiduels après l'action des molécules à action rapide.

On retrouve dans la littérature plusieurs essais d'associations sur des accès simples à *P. falciparum*. D'après Looareesuwan et al. l'efficacité de la doxycycline (250 mg quatre fois par jour *per os*) associée à 1) la méfloquine (750 mg administrés immédiatement, suivis de 500 mg 6 h plus tard *per os*) ou 2) à la quinine (600 mg toutes les 8 h pendant sept jours *per os*) montre des taux de guérison pour les deux groupes de 94% (44/47) et de 98% (45/46) respectivement. Les délais d'élimination des parasites et de la fièvre étaient plus courts pour le groupe traité par l'association avec la méfloquine, mais les différences n'étaient pas statistiquement significatives (42).

Son utilisation en association est d'autant plus intéressante depuis l'émergence de souches résistantes à la quinine dans le Sud Est de l'Asie : dans ces cas d'accès simples résistants à la quinine, l'association doxycycline + quinine affiche une efficacité entre 96 à 98% avec un temps d'élimination du parasite de 3 à 3.6 jours et une disparition de la fièvre en 2.6 jours (43) (44).

D'après Taylor et al. une étude menée en Nouvelle Guinée et en Indonésie, l'association chloroquine (10 mg/kg jour 1 et 5 mg/kg jour) et doxycycline (200 mg/ jour) a montré un taux de guérison de 90,9 % (20/22 patients) contre 64,7 % pour la doxycycline (11/17 patients) seule et 20% pour la chloroquine seule (4/20 patients). A noter que sur les 2 patients non guéris par l'association chloroquine/doxycycline, les souches présentaient une résistance importante (grade RIII) à la chloroquine (45).

D'après Cowell et al, dans le cas d'accès simples à *Plasmodium falciparum* chloroquino- résistants, l'association *per os* de quinine (640 mg 3 fois par jour pendant 3 jours + tétracycline (250mg 4 fois par jour pendant 7 jours) possède une efficacité de 96,6% vs 41,6%

pour l'association *per os* quinine 640 mg 3 fois par jour pendant 3 jours + chloroquine (1500 mg pendant 48h après l'administration de la quinine) (37).

En France, les dernières RCP issues de la SPILF sur l'usage de la doxycycline chez l'adulte recommandent l'utilisation de la doxycycline (ou de la clindamycine chez la femme enceinte ou l'enfant) en association à artésunate et quinine en cas de suspicion de souche de sensibilité diminuée à l'artésunate (retour de zones d'Asie du Sud-Est) (17).

B) En chimioprophylaxie

D'après la Haute Autorité de Santé (HAS) son emploi est indiqué dans la prévention anti-palustre du voyageur dans les zones d'endémie avec description de résistance (Amérique du Sud, Afrique centrale et de l'Est, Asie du Sud-Est, zones forestières de la Thaïlande, frontalières du Cambodge, du Myanmar et du Laos) et/ou de contre-indication ou d'intolérance à la méfloquine.

La posologie de la prophylaxie antipaludique recommandée prend en compte 2 catégories de patients :

- Chez l'adulte : 100 mg/j à commencer 2 jours avant le départ et à poursuivre 4 semaines après le retour.
- Chez l'enfant âgé de plus de 8 ans : 2.2mg/kg jusqu'à 100 mg aux mêmes schémas de prise que pour l'adulte (poids < 40 kg : 50 mg/j poids > 40 kg : 100 mg/j)

L'emploi d'une molécule en chimioprophylaxie est conditionné par certaines propriétés. Notamment les molécules à longue demi-vie sont privilégiées. De plus, il est démontré que l'observance thérapeutique est facilitée par des prises médicamenteuses espacées. Trois études randomisées, en double aveugle et contrôlées par placebo ont montré que chez des patients semi-immuns, 100 mg de doxycycline par jour engendraient une efficacité protectrice de 84 % (46) (47) (48). Une autre étude randomisée, en double aveugle, contrôlée par placebo a montré une efficacité protectrice de 99 % de la doxycycline à 100 mg par jour contre *P. falciparum* chez 67 soldats indonésiens non immunisés (49).

La demi-vie de la doxycycline étant courte, une prise strictement quotidienne au même moment de la journée est indispensable. Selon les dernières recommandations de la SPILF, la bonne tolérance de la doxycycline fait d'elle une bonne candidate en chimioprophylaxie malgré une prise journalière stricte. De plus, elle ne possède pas de limitation dans sa durée d'utilisation et convient donc bien aux séjours de longue durée à l'étranger.

Dans certains pays, l'économie et les facilités d'accès aux traitements anti-palustres constituent un véritable enjeu de santé publique d'avenir. La doxycycline possède également l'avantage d'être peu onéreuse : 11\$ en moyenne pour un séjour de 14 jours contre 84.64\$ pour la méfloquine et 113.39\$ pour l'atovaquone/proguanil (35) (50). Sur des usages au long cours telle que la chimioprophylaxie, le prix d'un traitement est un paramètre d'autant plus important.

Des cas d'échecs ont été décrits dans l'indication prophylactique à certaines occasions, mais par la suite ils ont été imputés à des problèmes d'observance. Tan et al. avaient décrit l'apparition d'accès à *P. falciparum* sous chimioprophylaxie. Après investigation, cet échec été imputé à une prise post retour de seulement 3 jours, ce qui a conduit à une révision du schéma prophylactique avec la poursuite des prises 4 semaines après retour de voyage (35). Trois essais randomisés ont confirmé l'efficacité de ce schéma prophylactique par doxycycline avec une efficacité entre 92% et 96% contre *P. falciparum* (35).

L'observance à la doxycycline est plus difficile qu'avec d'autres molécules, en raison de sa fréquence de prise, qui doit être quotidienne alors que d'autres molécules peuvent être prises sur un rythme hebdomadaire. Ainsi chez les personnes dont l'observance n'est pas imposée l'efficacité descend à 89% tandis que chez des personnes comme les militaires par exemple dont la prise est imposée, l'efficacité rapportée est de 96 à 99% (51).

C) Résistances décrites

Une seule étude fait état d'une baisse de la sensibilité à la doxycycline de *Plasmodium falciparum* par des tests *in vitro* : cette baisse de la sensibilité a été mise en relation avec des polymorphismes de séquences au niveau des gènes *pfmdt* et *pftetQ*. Toutefois, cette résistance n'a pas été démontrée *in vivo*. Jusqu'à aujourd'hui aucune résistance stable n'a été décrite cliniquement. Néanmoins ces données sont à prendre en considération : *Plasmodium falciparum* a le potentiel de développer des mécanismes de résistance envers les cyclines. En effet, la doxycycline est une molécule qui a été peu employée jusqu'à présent dans les pays d'endémie palustre. Elle pourrait bénéficier d'un phénomène d'épargne. On peut imaginer qu'un accroissement de l'usage de la doxycycline pourrait être suivi d'un développement rapide de résistances comme cela a été le cas historiquement pour plusieurs molécules anti palustres (52).

A l'inverse, l'usage de la doxycycline pourrait prendre de l'importance si le développement de résistances venait à augmenter sur les autres molécules anti-palustres. On peut aussi concevoir le fait que son usage pourrait permettre une épargne des molécules anti-

palustres et donc permettre un ralentissement de l'apparition de résistances aux autres molécules anti-palustres.

D) Tolérance, effets indésirables, contre-indications et interactions médicamenteuses :

a) Effets indésirables

La doxycycline est relativement bien tolérée sur le long terme et sans effets indésirables majeurs rapportés. D'après les données de sécurité du médicament, dans la littérature on retrouve parmi les effets indésirables :

Fréquents :

- Des troubles digestifs dans 4 à 33% des cas selon la littérature comprenant majoritairement nausées et douleurs abdominales (35). Les œsophagites et ulcérations de l'œsophage ne sont pratiquement plus signalées depuis l'usage de la forme monohydratée, moins ulcérate que l'ancienne formule mono-hyclate (53) (54) (55).
- Des signes cutanés dans 7,3 à 21,2% des cas de type d'urticaires, photosensibilisations graves (56) (35), exfoliations, éruptions cutanées (56) et parfois de photo-onycholyses (35) (57) (58). Néanmoins, la photosensibilisation est un effet indésirable contrôlable par l'usage de mesures protectrices au soleil telles que des vêtements couvrants ou de crème solaire (58). De plus, elle est dépendante du phénotype de peau et est proportionnelle à la clarté du teint de la peau ; ainsi chez les caucasiens, d'après Tank et al. jusqu'à 50% des sujets seront photo-sensibilisés (35) (59). Elle serait également proportionnelle à la dose administrée (59). La gravité des effets indésirables cutanés est peu importante. Ils nécessitent rarement un besoin d'hospitalisation. Néanmoins leur apparition et les gênes occasionnées potentielles ont pour conséquence un arrêt prématuré fréquent de la chimioprophylaxie à l'initiative du patient (35).

Peu fréquents :

- Des troubles du sommeil dans 1,3 à 14% des cas (60).
- Des courbatures dans environ 10% des cas (60) (61) (62).
- Des candidoses vaginales peuvent survenir chez environ 1% des femmes (63).

Rares :

- Des cas d'hypertension intracrânienne ont été répertoriés parmi des patients sans risque cardiovasculaire ou neurologique avec la doxycycline pendant une chimioprophylaxie du paludisme (64).

- Une néphrotoxicité importante a été rapportée avec l'usage de méthyl furane, conduisant à une contre-indication de leur association par précaution (56).
- De rares cas d'hépatotoxicité ont été rapportés, néanmoins il existe des facteurs confondants avec d'autres thérapies hépatotoxiques concomitantes qui laissent planer le doute quant à l'impact hépatotoxique de la doxycycline (65).

Enfin, les principaux facteurs limitant l'utilisation de la doxycycline en CP sont les troubles gastro-intestinaux et le risque de photosensibilisation. Plusieurs études comparatives ont conclu à une meilleure tolérance générale de la doxycycline avec moins d'effets indésirables et de moindre gravité par rapport aux autres prophylaxies anti-palustres (66) (67)

b) Contre-indications :

La doxycycline est contre-indiquée chez la femme enceinte, en raison du risque tératogène et chez le jeune enfant âgé de moins de 8 ans pour la prophylaxie à long terme, en raison d'effets indésirables tels que la décoloration des dents et l'hypoplasie de l'émail. Ces contre-indications sont issues des premières études de la doxycycline qui étaient finalement assez limitées et qui avaient conduit à des recommandations basées sur un principe de précaution (65). D'après Gaillard et al., Todd et al. et Cross et al., les effets indésirables qui avaient motivé les contre-indications précédentes ne seraient pas significativement plus importants que dans une population non traitée, que ce soit pour la grossesse ou les enfants ≤ âgés de moins de 8 ans. Ces études suggèrent que les usages à court terme de la doxycycline ne sont pas responsables de ces effets indésirables (65) (68) (69). Gaillard et al. suggèrent que l'usage de la doxycycline dans les thérapies anti-palustres pourrait être étendu, tout en gardant une sécurité d'emploi durant la grossesse, à condition de l'utiliser après la 13^{ème} semaine d'aménorrhée (65).

c) Interactions médicamenteuses :

Au sujet des modifications de métabolisme que peut entraîner la doxycycline sur les autres médicaments, la doxycycline a montré une légère activité inhibitrice du cytochrome P3A4 (CYP3A4). Et bien que le CYP3A4 soit un système largement impliqué dans le métabolisme de nombreux médicaments, les interactions de la doxycycline sont peu décrites (35).

Elle est capable d'augmenter les concentrations sériques de la digoxine chez certains individus sans que les raisons en soient connues (35). Comme beaucoup d'antibiotiques, elle pourrait potentialiser l'effet des anti-vitamine K (55).

Concernant son propre métabolisme pharmacocinétique, seule quelques interactions médicamenteuses sont à noter, dont la répercussion principale se limite à une baisse des concentrations sériques en doxycycline (35). En effet, il existe des baisses de l'absorption de la doxycycline, qui se rencontrent notamment avec les médicaments antiacides, les laxatifs, les sources de cations trivalents dont le fer principalement et les sources riches en calcium (35). Également, les médicaments inducteurs enzymatiques au niveau hépatique conduisent à la diminution de la demi-vie de la doxycycline. C'est le cas notamment de plusieurs antiépileptiques dont les barbituriques, carbamazépine, phénytoïne qui diminuent la demi-vie de la doxycycline. La description de ce phénomène a conduit à la recommandation du doublement de la posologie journalière de doxycycline pour les patients prenant des antiépileptiques (35) (70).

Perspective et développement :

Le développement de l'intérêt pour les cyclines et en particulier de la doxycycline a généré récemment de nouveaux dérivés de la famille des cyclines. Une amélioration de l'activité ainsi que de la tolérance, en particulier chez la femme enceinte et l'enfant est recherchée. Ils pourraient fournir une option thérapeutique importante à considérer dans la lutte contre le paludisme. Mais il reste quelques étapes dans l'amélioration de la connaissance de son mode d'action anti-plasmodiale, afin d'élargir son rôle dans la lutte anti-plasmodiale. Il s'agit notamment de mieux comprendre son action rapide et tardive et les mécanismes intrinsèques de chacune de ces actions.

1.2.3 Mécanisme d'action

Ces propriétés antibactériennes ont été largement étudiées et ont permis une bonne compréhension du mécanisme d'action de la doxycycline. Son activité antibactérienne s'explique par le blocage de la traduction protéique des ribosomes chez les procaryotes par la fixation d'acide ribonucléique de transfert (ARNt) sur diverses sous unités ribosomales dont la principale est la petite sous unité 30S (71).

En revanche, son activité anti-plasmodiale est moins claire et pourrait impliquer plusieurs mécanismes dont certains probablement proches de son activité antibactérienne.

Il est intéressant de noter que la doxycycline agit en deux temps, avec un effet toxique immédiat et un effet toxique décalé, mesurable après une division cellulaire. L'effet immédiat est considéré comme non spécifique, agissant sur une ou des cibles encore imparfaitement

élucidées. L'effet retardé lui est mieux décrit dans la littérature et incrimine l'apicoplaste comme cible.

Chez les eucaryotes, le mécanisme d'action apicoplastique impliquerait le blocage des sous unités ribosomales 70S et 80S (71). La doxycycline possède une action sur ces 2 sous unités mais son activité anti-plasmodiale serait due à son activité anti 70S (72). Ces ribosomes sont étroitement liés à l'activité mitochondriale et apicoplastique plasmodiale.

Dahl et al. ont caractérisé le mécanisme anti-plasmodiale de la doxycycline. Pour ce faire, des parasites préalablement synchronisés ont été traités au stade trophozoïte jeune par 1µM de doxycycline pendant 24h (73).

Un examen des formes parasitaires par microscopie optique et électronique a été réalisé. Il n'a pas été visualisé de modification du cycle parasitaire lors de son 1er cycle (48h), ni de décalage de l'évolution des formes asexuées au cours du cycle parasitaire. C'est-à-dire que les schizontes ont été capables de produire des mérozoïtes et d'enclencher un second cycle parasitaire avec invasion des globules rouges (GR). Cependant, au fur et à mesure de la progression vers le stade schizonte du 2ème cycle parasitaire, ces schizontes ont commencé à présenter des anomalies morphologiques de plus en plus prononcées. Quarante-huit heures après l'initiation du 2^{ème} cycle parasitaire et l'arrivée en stade schizonte, les schizontes auraient dû éclater et libérer les mérozoïtes définissant l'entrée dans un 3ème cycle parasitaire. Au lieu de cela, la phase schizonte s'est poursuivie au-delà des 48h sans aboutir à un éclatement de ceux-ci. Cette absence d'initiation de 3^{ème} cycle a conduit à la dégénérescence, puis à l'apoptose d'une majorité de schizontes (73).

En parallèle, l'étude des organelles de *Plasmodium falciparum* soumis à la doxycycline à 1 µM pendant 24h a été réalisée par microscopie à fluorescence grâce à des marqueurs d'activité métabolique fluorescente. Les auteurs ne retrouvent pas d'altération en fluorescence du développement des mitochondries de *Plasmodium falciparum* au cours du cycle parasitaire du trophozoïte au schizonte par rapport au témoin non traité. En revanche, ils mettent en évidence un ralentissement tardif du développement du réseau apicoplastique sous doxycycline à partir des schizontes jeunes du second cycle parasitaire et qui se solde par la mort du parasite à son terme (Figure 11) (73).

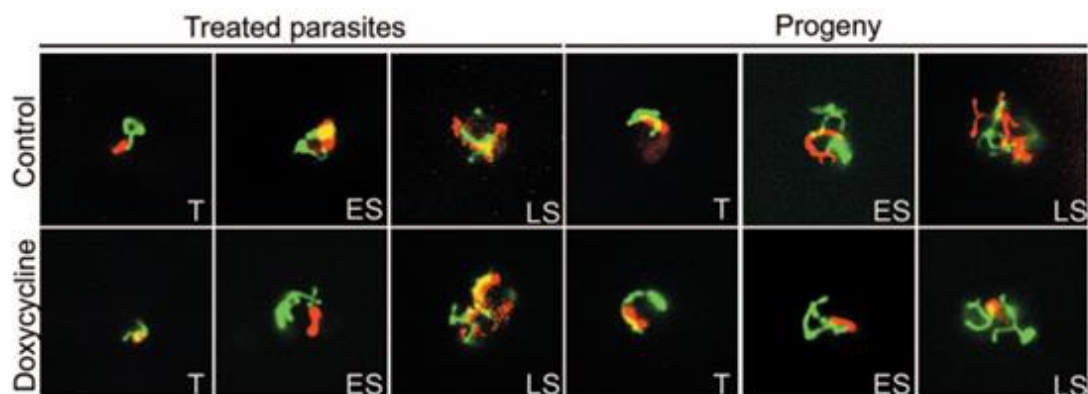


Figure 11 : Observation par microscopie à fluorescence d'organelles de *P. falciparum* soumis à la doxycycline 1 μ M (73)

Légende : Vert : réseau mitochondriale, Rouge : réseau apicoplastique ; Treated parasite : parasite traité, Progeny : progéniture (parasite du 2nd cycle), control : contrôle, T : trophozoïte, ES : schizonte jeune, LS : schizonte âgé.

Yeh et al. et Okada et al. sont venus confirmer que l'apicoplaste est une cible importante de la doxycycline. En effet, cet organite est impliqué dans de nombreuses voies anaboliques et de synthèse de métabolites pour la croissance du parasite. Les voies comprennent des réseaux de biosynthèse dans les acides gras de type II, le fer-souffre, l'acide lipoïque et l'hème, la synthèse de nombreuses molécules de la famille des isoprénoïdes. En effet, ils ont montré que 200 μ M d'isopentényl pyrophosphate, un dérivé isoprénoïde essentiel pour *Plasmodium falciparum* de synthèse apicoplastique, était capable de sauver le parasite d'une soumission à 10 μ M de concentration sérique de doxycycline, prouvant une activité spécifique sur l'apicoplaste (74) (75).

Krungkrai et al. et Goodman et al. ont défini l'activité schizonticide des cyclines comme retardée (intervenant dans un délai >48h à l'introduction de la chimiothérapie) à la concentration sérique de 1-3 μ M. Cette activité retardée s'expliquerait par un transfert d'apicoplaste défectueux à la descendance de la 1^{ère} génération de parasite et qui conduisent à la mort du parasite sur son second cycle (76) (77).

D'après Kennedy et al. lors du 1^{er} cycle, suffisamment de dérivés isoprénoïdes seraient synthétisés avant le blocage des apicoplastes, pour permettre au parasite son développement jusqu'au schizonte. (78) En revanche, les apicoplastes défectueux des trophozoïtes du second cycle sont incapables de synthétiser un nouveau stock d'isoprénoïdes, ce qui finirait par conduire à un blocage de la maturation du parasite puis à sa mort (75) (78) (79).

Dans ce sens, ces auteurs ont également démontré que la doxycycline dès 1 μ M pendant 24h est responsable d'une baisse importante de l'activité de transcription du génome apicoplastique à partir du 2^{ème} cycle parasitaire seulement (78).

D'après Okada et al. il existe également un mécanisme d'action précoce en relation avec l'apicoplaste et le métabolisme du fer dès le 1^{er} cycle parasitaire (<48h) à plus forte posologie équivalente à une concentration supérieure à 10 µM de doxycycline. Ce mécanisme d'action, toujours en lien avec l'apicoplaste, serait distinct de celui opérant dès 1-3µM de doxycycline. Le fer constitue un élément indispensable à la survie du parasite par son utilisation dans diverses cascades métaboliques (75). Okada et al. avancent 2 hypothèses quant à ce mécanisme.

- La première est que la doxycycline possède une nature chélatrice et entraîne une séquestration directe du fer dans le parasite en s'y liant dans l'apicoplaste, le rendant ainsi non disponible (75).
- La seconde est que la doxycycline se lie à des cibles macromoléculaires telles que les métalloenzymes parasitaires et ainsi bloquerait la disponibilité du fer pour le parasite. (75)

Okada et al. insistent sur le fait que ce mécanisme d'action se déroule à une concentration sérologique supérieure à 10 µM correspondant à une administration journalière de 500 à 600 mg doxycycline (75).

D'après Yeo et al. la doxycycline serait capable de diminuer significativement la synthèse des nucléotides et des désoxynucléotides (nucleoside-5'-triphosphates (NTPs) et 2'-deoxynucleoside- 5'-triphosphates (dNTPs)) chez *P. falciparum* avec pour conséquence la mort apoptotique du parasite (80).

D'après Okada et al. il existerait également un mécanisme d'action immédiat de la doxycycline à une concentration supérieure à 20µM qui ne concernerait pas l'apicoplaste sans en détailler le mécanisme. Néanmoins cette concentration sérique n'est pas compatible avec un usage chez l'homme (75).

Goodman et al. rapporte qu'en microscopie optique et à fluorescence ils n'ont pas observé de modification morphologique apparente des parasites traités par doxycycline dans les premières 48h à des posologies allant de 2,5 µM à 3 0µM de doxycycline (77).

La doxycycline est active sur les 3 formes parasitaires érythrocytaires du stade asexué : les trophozoïtes jeunes (ou anneaux), les trophozoïtes âgés et les schizontes (81).

Néanmoins d'après Dhal et al. il existe une différence d'efficacité de la doxycycline selon le moment d'administration du traitement ainsi que de la durée de traitement (73).

Les stades les plus sensibles à la doxycycline seraient les trophozoïtes âgés et les schizontes jeunes (73). On observe également qu'une incubation par doxycycline 1 μ M de ces 2 stades produit une baisse de la parasitémie similaire à une incubation sur un cycle parasitaire complet (48h). On observe comme rapportée par Okada et al. une augmentation de l'activité antiparasitaire proportionnelle à l'augmentation de la concentration en doxycycline (75).

L'ensemble de ces résultats élargissent la compréhension des mécanismes antiparasitaires de la doxycycline et suggèrent de réétudier la doxycycline comme un antipaludéen à action plus rapide à dosage plus élevé (31) (65).

1.3 La microscopie électronique dans l'étude morphologique de *Plasmodium falciparum*

Les molécules anti-plasmodiales possèdent des mécanismes d'action complexes, parfois encore imparfaitement élucidés. Les approches biochimiques et moléculaires de ces dernières années ont permis de comprendre en partie leurs mécanismes d'action d'un point de vue théorique. La microscopie électronique à transmission constitue un formidable outil dans cet objectif car elle permet de visualiser les modifications directes d'une chimiothérapie sur les organelles du parasite et donc d'aider à comprendre le lieu et le mode d'action des médicaments.

1.3.1 Principes généraux de la microscopie électronique à transmission

Dans cette partie, nous nous concentrerons sur les principes techniques et les technologies les plus employés en microscopie électronique à transmission (MET) appliqués à la biologie cellulaire et organique.

La MET permet une analyse morphologique, structurale et chimique d'échantillons solides à l'échelle atomique. A quelques différences près, la microscopie électronique possède un fonctionnement proche de la microscopie optique. Ces deux techniques diffèrent principalement par leurs source énergétique. En microscopie optique, l'observation d'un échantillon est réalisée par le passage de photons au travers d'un échantillon tandis qu'en microscopie électronique elle se fait par le passage d'électrons au travers de l'échantillon. Quel que soit l'outil utilisé, le caractère ondulatoire de la source énergétique, que ce soient des photons ou des électrons, impose une limitation sur la taille des objets que l'on peut observer en microscopie.

Selon la théorie d'Abbe, la limite de résolution **d** (la plus petite distance en dessous de laquelle 2 points ne peuvent plus être distingués) varie selon l'indice de réfraction **n**, la limite de longueur d'onde d'illumination λ , et de l'angle de l'illumination de la lumière sur l'échantillon α .

$$d = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha}$$

Sinus α est une valeur invariable.

Considérant cette équation, il existe uniquement deux moyens de jouer sur la résolution. Le premier est de jouer sur **n, l'indice de réfraction** qui correspond à l'atténuation de la source énergétique au travers de la matière qu'elle traverse. En microscopie optique, le verre est le seul matériel employé et son indice de réfraction possède une valeur peu modulable de l'ordre de 1.5. En microscopie électronique, le passage de la source énergétique se fait au travers de vide qui possède l'avantage d'avoir un indice de diffraction $n=1$ permettant une amélioration modeste de la résolution. Jouer sur l'indice de réfraction ne permet en réalité qu'un faible gain de résolution.

Le second moyen d'améliorer la résolution est de jouer sur λ : **la longueur d'onde de la source énergétique**. L'utilisation de certaines sources permet un gain très important en résolution. Il existe différentes longueurs d'ondes exploitables. La microscopie optique utilise celles des photons lumineux, situées dans le domaine du visible entre 400 nm et 700nm.

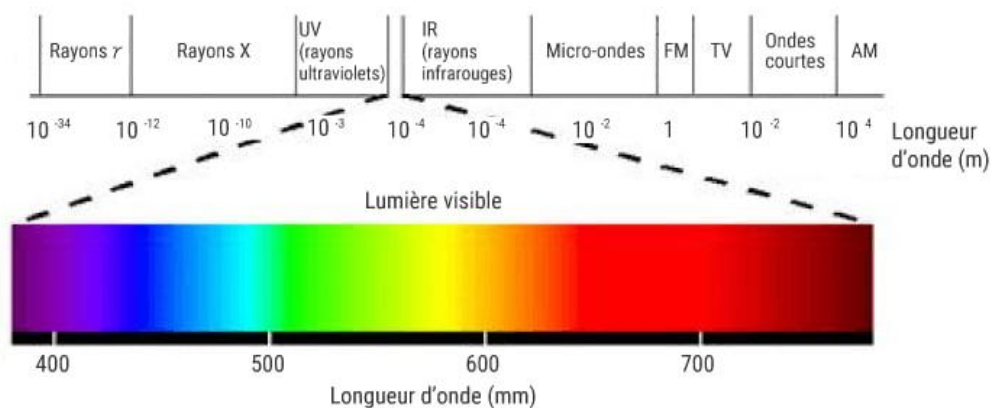


Figure 12 : Schéma de représentation du domaine ondulatoire des sources électromagnétiques

D'après la loi de Rayleigh, la résolution ne pourra être inférieure à la moitié de la longueur d'onde utilisée. Ainsi la résolution d'un microscope optique ne pourra dépasser 0.2 μm .

Dans l'éventail des ondes électromagnétiques accessibles, les électrons possèdent une longueur d'onde 10 000 fois moins importante que celle de la lumière photonique. Leur utilisation permet d'obtenir une résolution 10 000 fois supérieure à celle d'un photon et d'atteindre l'observation de structure de l'ordre de 10^{-3} nm (nanomètres). La microscopie électronique diffère principalement de la microscopie optique par l'exploitation d'ondes électromagnétiques générées par les électrons et des diverses adaptations matérielles nécessaires à l'optimisation de cette source.

En MET, la résolution est optimisée par l'obtention d'électrons à la longueur d'onde la plus importante possible. En effet la longueur d'onde d'un électron est variable et est proportionnelle à sa tension d'accélération V .

$$\lambda = \frac{1.23}{\sqrt{V + 10^{-6} V^2}} \text{ nm.}$$

En MET appliquée à la biologie cellulaire, on produit classiquement des tensions d'accélération V de l'ordre de 100 kV à 300 kV correspondant à des électrons d'une longueur d'onde comprise entre $33,7 \cdot 10^{-3}$ nm et $31,97 \cdot 10^{-3}$ nm. Elles permettent ainsi l'accès à une résolution maximale de l'ordre de 2×10^{-3} nm (82).

La composition matérielle d'un microscope électronique à transmission est adaptée à cette source électromagnétique et emploie des lentilles électromagnétiques pour recondenser le faisceau d'électrons, le tout dans une colonne de vide maintenue à 10^{-9} atm (le passage des électrons étant ralenti dans l'air en la raison de présence d'atomes), un système d'acquisition et de correction des images (Figure 13), et un conditionnement particulier des échantillons tant en préparation que coloration. Une des sources d'électrons les plus employées en MET pour la biologie cellulaire est l'usage d'un cristal lanthanum hexaboride LaB6.

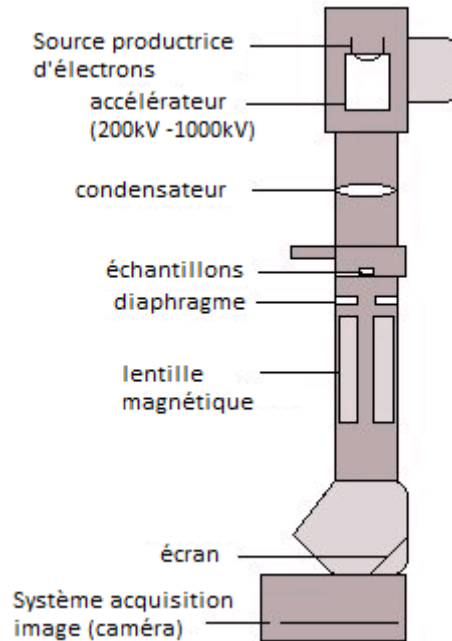


Figure 13 : Schéma d'un microscope électronique à transmission

De manière synthétique, les différentes étapes pour obtenir une image en MET sont les suivantes :

- a. Préparation de l'échantillon mince
- b. Passage du faisceau d'électrons à travers la coupe de l'échantillon
- c. Coloration ou gain de contraste
- d. Transmission des électrons et transformation du signal en image

a) Préparation de l'échantillon mince en vue de l'analyser en MET :

Les matières biologiques sont des structures déformables et fragiles. La MET soumet de fortes contraintes à ces dernières à cause du rayonnement intense des électrons et de la pression créée par un environnement conditionné sous vide. Pour conserver les structures des échantillons, ceux-ci doivent donc subir une préparation adéquate. Le choix du type de préparation dépend de la nature des échantillons et de leur taille.

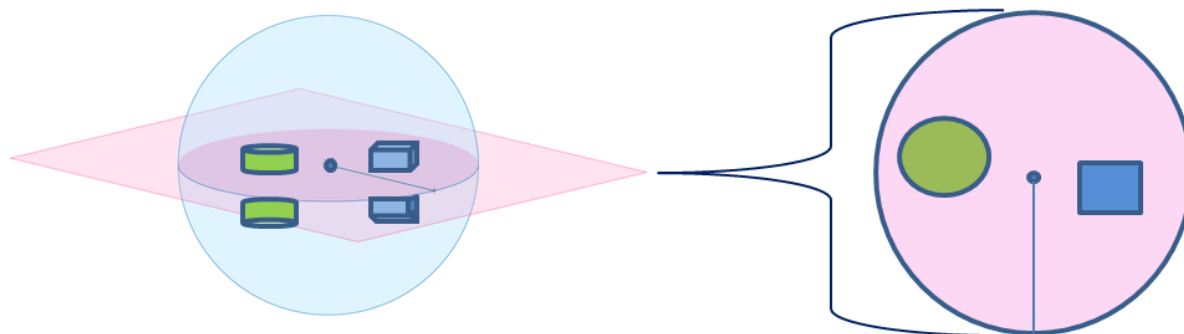
Dans un premier temps, pour rendre les structures organiques résistantes et dans un état observable proche de leur état naturel, il est nécessaire de fixer le prélèvement. Cette fixation consiste en une consolidation des différentes structures biologiques lipoprotéiques cellulaires comprenant les membranes et le cytosquelette.

On retrouve deux procédés de fixation :

- La fixation chimique : la plus couramment employée est la fixation au glutaraldéhyde, ou au tétr oxyde d'osmium. Ces fixateurs permettent la consolidation des structures lipoprotéiques cellulaires et la conservation des échantillons pendant plusieurs semaines à 4°C en milieu liquide. Elle est suivie d'un procédé de déshydratation par des solvants organiques de type éthanol ou acétone, afin d'éliminer l'eau intracellulaire. L'échantillon fixé et déshydraté est ensuite inclus dans de la résine qui est polymérisée par chauffage. Cette polymérisation va permettre la consolidation des structures biologiques ainsi que l'inclusion de celle-ci dans un bloc solide compatible avec la préparation de l'échantillon en MET.

- La fixation physique par cryo-fixation : elle consiste en une congélation ultrarapide des échantillons sur un bloc de cuivre refroidi à l'hélium ou à l'azote liquide. Cette congélation permet la formation de glace amorphe. Celle-ci possède les avantages de mieux préserver l'aspect ultra-structural des cellules à une échelle supérieure de la fixation chimique. Elle fixe immédiatement les structures et permet l'étude biodynamique de comportements biologiques. En revanche, elle est beaucoup plus lourde et difficile à mettre en place, tant sur la réalisation que sur la conservation des échantillons (82) (83) (84). En pratique courante elle est finalement assez peu utilisée, et c'est la fixation chimique qui prédomine largement.

Une fois l'étape de consolidation des structures cellulaires effectuée, les échantillons doivent être rendus suffisamment minces (<100 nm) pour être traversés par le faisceau d'électrons. On réalise la coupe au moyen d'outils spécialisés extrêmement précis appelés ultramicrotomes, utilisant des lames en diamants pour permettre des coupes franches, lisses et dépourvues d'imperfections. Cet amincissement est obtenu par une coupe transversale (B) au sein d'un échantillon en 3 dimensions (3D) obtenue précédemment dans la résine (A) (Figure 14).



(A) Échantillon en 3 dimensions

(B) Plan de coupe en 2 dimensions

Figure 14 : Représentation d'un échantillon en perspective (A) et de sa coupe (B)

La coupe transversale permet l'observation des structures intracellulaires en 2 dimensions (2D) qui sont situées sur le plan de coupe. L'observation en MET peut s'arrêter à une observation de cette coupe en 2D. On peut aussi obtenir une reconstruction en 3D de l'échantillon par reconstruction informatique de l'observation et assemblage des coupes 2D successives.

La coupe est ensuite déposée sur une grille en cuivre. Elle est composée de barreaux superposés qui délimitent des mailles supportant la coupe de l'échantillon (Figure 15).

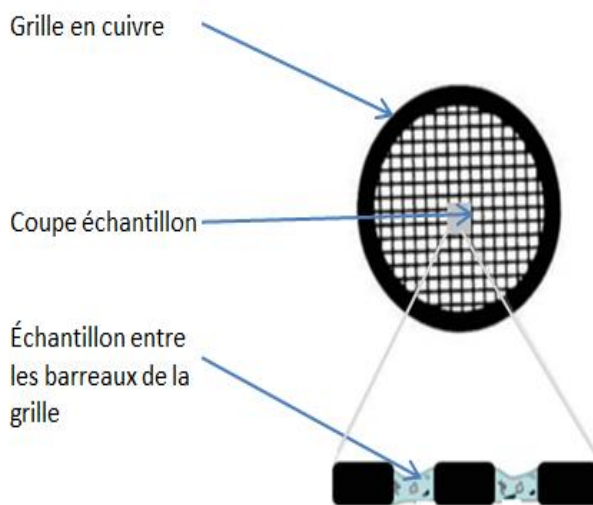


Figure 15 : Représentation schématique d'une coupe d'échantillon sur une grille en cuivre

b) Passage du faisceau d'électrons à travers la coupe :

De façon simplifiée, l'épaisseur de l'échantillon étant faible, on considère que statistiquement les électrons ne traversent qu'une seule fois l'échantillon et n'interfèrent qu'avec 1 seul atome à la fois. Au cours du passage dans la matière ils subissent deux phénomènes de diffusions (Figure 16) (85) (86) (87) (88).

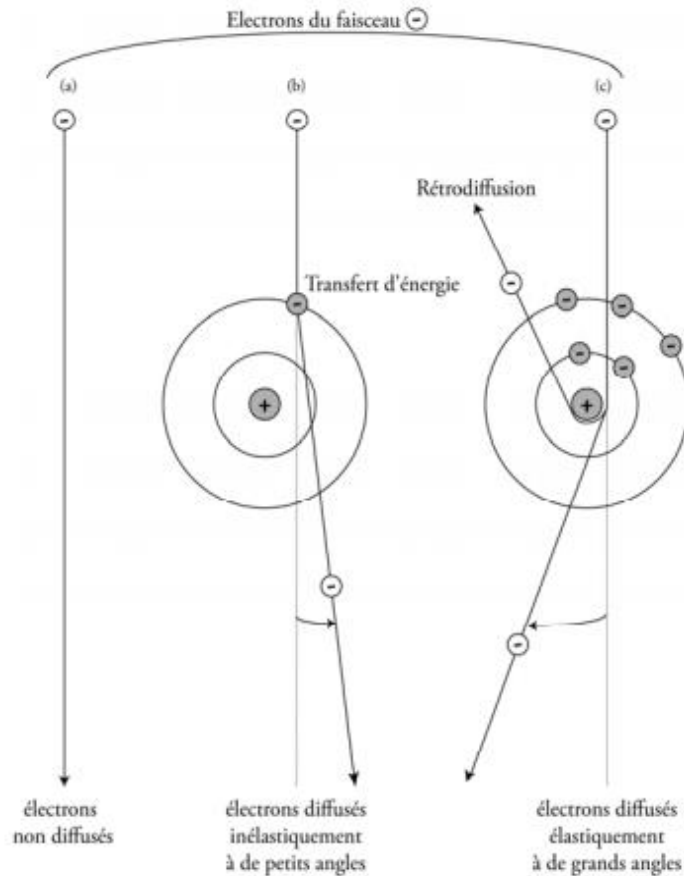


Figure 16 : Comportement des électrons dans une colonne de MET au passage d'un échantillon (85)

- Le premier est celui de la diffusion inélastique. L'électron incident percute un électron de l'atome de l'échantillon, qui est dévié à petit angle. Elle conduit à un changement de longueur d'onde de l'électron. Ces électrons ne sont pas exploités dans le cadre de la MET et les signaux qui en découlent sont éliminés.
- Le second est celui de la diffusion élastique et qui est exploité dans la MET. L'interaction Coulombienne de l'électron incident avec le noyau de l'atome donne lieu à une déviation de grand angle de l'électron incident au passage de l'échantillon. La déviation est proportionnelle au numéro atomique de l'atome.

L'obtention d'une image est ensuite réalisée par la visualisation de différences de contrastes issues de la diffusion élastique par deux phénomènes concomitants :

- Par contraste d'amplitude : l'image est créée à travers un diaphragme objectif qui va éliminer les électrons fortement déviés faisant apparaître les zones en noir (absence d'électron), et conserver les électrons faiblement déviés faisant apparaître les zones en clair (Figure 17).

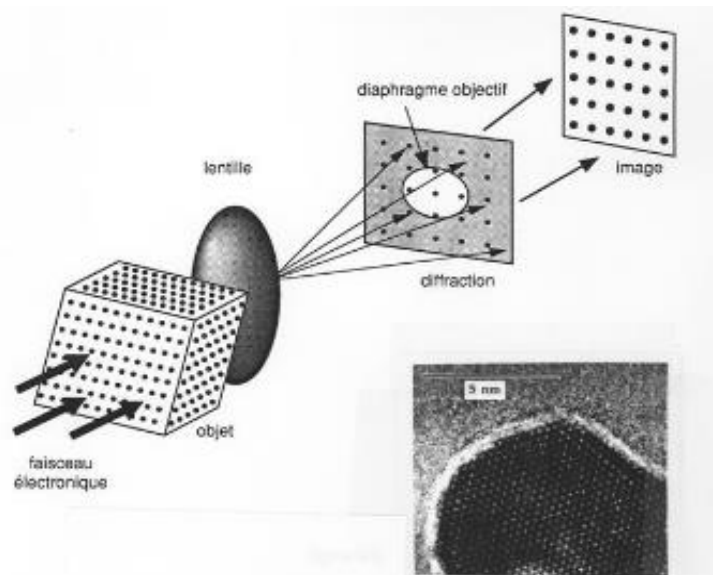


Figure 17 : Schéma de déviation des électrons dans une observation en MET (85)

- Par contraste de phase : pour rappel, le caractère ondulatoire de l'électron est proportionnel à son énergie. Lors du passage de l'électron au travers de l'échantillon, celui-ci va avoir une variation de son caractère ondulatoire et donc de son énergie, en fonction de son interaction avec le noyau atomique rencontré. Le contraste de phase consiste en la mesure du décalage ondulatoire des électrons qui passent au travers de la matière.

c) Coloration ou gain de contraste :

En MET, il est possible d'améliorer les images par un processus de coloration des échantillons. La coloration constitue un abus de langage, il est plus approprié de parler de gain de contraste. Comme expliqué précédemment, l'électron émis interagit avec le noyau de l'atome. Plus l'atome est lourd, plus les électrons sont déviés et on obtient des différences de contraste importantes conduisant à une image plus détaillée.

Les échantillons biologiques sont majoritairement composés d'atomes légers C, H, O et N qui conduisent à de faibles déviations et donc à de faibles différences de contrastes. On cherche à augmenter ce contraste par l'ajout de sels de métaux lourds, à numéro atomique élevé, permettant d'observer des différences de déviation plus importantes.

Parmi les plus employés on retrouve l'acétate d'uranyle, le molybdate, le phosphotungstate et le citrate de plomb (85). Ils vont venir imprégner les différentes structures cellulaires et y augmenter l'intensité des contrastes. Ils sont ajoutés sur les coupes d'échantillons par des bains successifs dans des solutions contenant ces produits contrastants.

d) Transmission des électrons et transformation du signal en image :

Les électrons représentent une certaine masse d'énergie, leur énergie varie également en fonction de leur phase ondulatoire. Cette énergie est le produit du contraste d'amplitude et du contraste de phase (lié à la λ de l'électron).

Cette énergie arrive sur des millions de capteurs d'énergies qu'on peut représenter comme des pixels. L'énergie est captée sous forme d'un signal directement proportionnel à cette énergie et analysée par la transformation de Fourier.

Les zones denses en matières vont fortement dévier les électrons et donc on aura une absence de signal qui peut être défini comme zone noire sur l'image, tandis que les zones peu denses vont faiblement dévier les électrons et on aura une concentration forte d'électrons non diffus qui peut se définir comme une zone blanche sur l'image. On obtient des nuances de contraste, liées aux différentes densités des zones traversées, allant du noir au blanc passant par le gris (Figure 18).

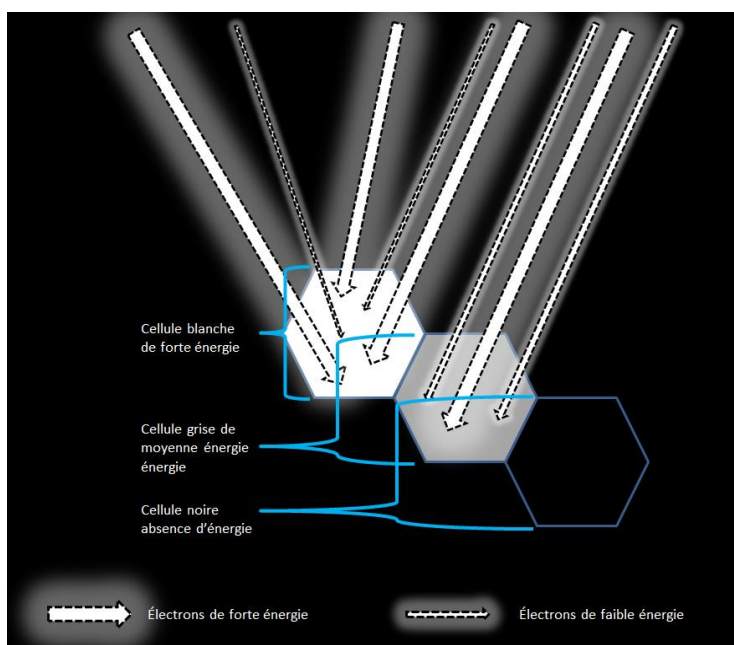


Figure 18 : Représentation de la formation d'image en MET

Il existe deux procédés pour la transformation de l'énergie en signal puis en image :

- Obtention d'une image analogique : un écran phosphorescent placé directement sous la colonne est visible par l'opérateur au travers d'un écran en verre plombé. Il renvoie le signal lumineux par phosphorescence vers l'opérateur sous forme de signal jaune vert. L'intensité de phosphorescence est proportionnelle à l'énergie qui arrive sur la cellule qui est renvoyée vers l'opérateur. Plus une cellule reçoit d'énergie, plus elle renvoie de la lumière vers l'opérateur qui la perçoit comme vert sur fond noir. A l'inverse, une

absence d'énergie sera perçue comme noire. Cette image permet une observation rapide de l'échantillon, sans pouvoir toutefois en sauvegarder les données.

- Obtention d'une image numérique : il existe plusieurs technologies de formation d'image numérique. On emploie le plus souvent une caméra CCD (Charge Coupled Devices) placée dans l'alignement de la colonne. Elle est composée de millions de capteurs d'énergie sous une forme assimilable à des pixels en nids d'abeilles. Elle permet une mesure de l'énergie individuellement par pixels, avec une sensibilité de l'ordre de 5 à 182 électrons par pixels (89). On emploie couramment des caméras CCD allant jusqu'à 4K (définition supérieure à 3840 pixels de large), soit au minimum une résolution de 3840 x 2160 pixels. (90). En comparaison à l'image analogique, le temps d'acquisition est plus long mais l'image peut être sauvegardée et exploitée par la suite.

1.3.2 Observation de *Plasmodium falciparum* en MET et description de son ultrastructure

Il y a plusieurs décennies, la MET a permis l'analyse de l'ultrastructure cellulaire de nombreux pathogènes. Puis elle a été supplantée par l'engouement pour l'analyse génétique des microorganismes avant de connaître un regain d'intérêt cette dernière décennie.

Plus précisément, concernant le parasite *Plasmodium sp*, la description ultra structurale a permis de comprendre la proximité phylogénétique entre les plasmodies et d'autres protozoaires comme les piroplasmes ou le toxoplasme, tous possédant des complexes apicaux impliqués dans l'invasion cellulaire et tous faisant partie du groupe des *Apicomplexa*. La visualisation de certains des éléments ultra structuraux a permis de comprendre des observations déjà faites en microscopie optique, telles que les taches de Maurer et les particularités des différents stades morphologiques parasitaires.

Description de l'ultrastructure des différents stades parasitaires de *Plasmodium falciparum* en MET :

Ce travail porte sur l'étude des modifications du parasite lors de sa phase asexuée. Nous nous intéresserons donc seulement à la description de ces stades. En l'absence de contraintes par une chimiothérapie, l'étude en MET d'un parasite aux stades physiologiques représente à elle seule un vrai défi par sa complexité. Une connaissance ultra structurale complète des différents stades physiologiques du parasite est nécessaire avant d'entreprendre l'étude ultra structurale des modifications du parasite sous chimiothérapie.

Les grandes lignes conductrices du développement du parasite au cours du stade asexué sont :

- Le parasite est intracellulaire et localisé dans une vacuole parasitophore, que ce soit à l'intérieur du globule rouge ou de l'hépatocyte.
- Le parasite se développe tout au long de son cycle grâce notamment à la digestion des composants érythrocytaires dont le cytosol et l'hémoglobine.
- Le développement du parasite à l'intérieur du globule rouge induit des modifications importantes au niveau de la structure de la membrane érythrocytaire.
- Lors de sa phase asexuée, le parasite passe par 4 stades distincts morphologiquement et fonctionnellement : le mérozoïte, le trophozoïte jeune, le trophozoïte âgé et le schizonte.

1.3.2.1 Le mérozoïte

Le mérozoïte de *P. falciparum* se présente sous la forme d'un citron ovoïde avec une extrémité plus prononcée qui constitue la partie apicale du parasite. Il constitue la plus petite forme parasitaire du cycle avec une taille moyenne de 1.6 µm de long sur 1 µm de large. Cette petite taille ne l'empêche pas de transporter un bagage technique complet afin de procéder à l'échappement du système immunitaire, à l'invasion d'un nouveau globule rouge et à sa maturation pour la suite du cycle parasitaire (91).

Leur observation dans un stade proche de celui qui se retrouve dans la circulation sanguine se fait le plus souvent par leur observation au sein de schizontes mûrs, prêts à éclater, bien qu'il soit possible aussi de les isoler par des protocoles spécifiques.

Surface extracellulaire :

Le mérozoïte est recouvert de nombreuses protéines de surface nommées mérozoïte surface protein (MSP1) qui constituent une épaisse couche de poils broussailleux (Figure 19) (92) (93). Ces poils servent au cours de la phase d'invasion des globules rouges (92).

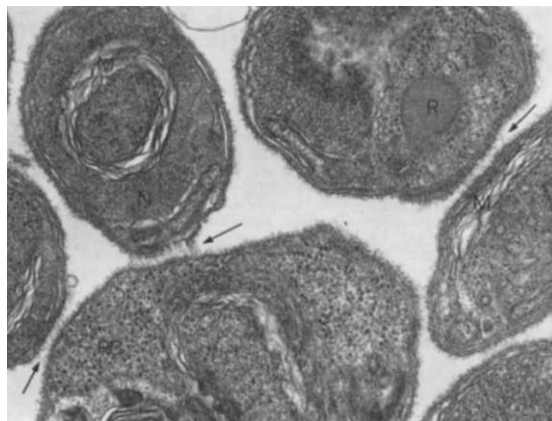


Figure 19 : Images en MET d'un mérozoïte de *P. falciparum* avec observation de protéines MSP1 (92)

Légende : (grossissement x 47 000) ; Flèche noire : MSP1,

Le mérozoïte perd ces structures particulières après invasion d'un globule rouge (91) (92) (94).

Membranes intracellulaires :

On retrouve deux membranes rattachées à la première membrane extracellulaire par des ponts filamenteux transversaux. Le feuillet constitué des trois membranes est appelé pellicule parasitaire (Figure 20) (91).

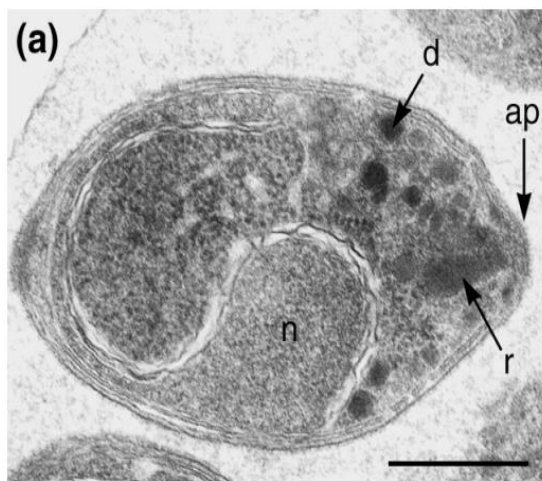


Figure 20 : Image en MET d'un mérozoïte de *P. falciparum* avec visualisation des membranes et des organelles (91)

Légende : la bar représente 5µm ; d : granule hyperdense ; ap : protubérance apicale avec zone assombrie correspondant à l'anneaux polaire ; r : rhoptrie ; n : noyau

Les deux membranes les plus internes font le tour complet du parasite à l'exception de la protubérance apicale. Cette configuration des membranes joue un rôle important dans la phase d'invasion (91) (95).

Organisation apicale :

Le feuillet membranaire composé des trois sous membranes s'ouvre à la partie apicale du parasite. On y retrouve trois anneaux polaires laissant un passage aux rhoptries vers le milieu extracellulaire. Ces anneaux sont eux-mêmes rattachés à l'extrémité apicale du parasite par un réseau complexe de microtubules (Figure 21) (91) (95).

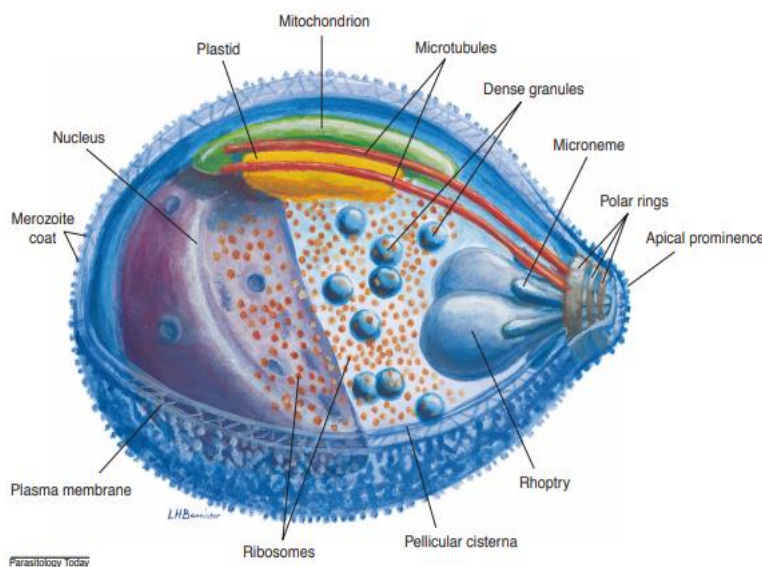


Figure 21 : Représentation schématique d'un mérozoïte avec visualisation des organelles (91)

Légende : Plasma membrane : membrane plasmique ; Ribosomes : ribosome ; Pellicular cisterna : citerne pelliculaire ; Rhoptry : rhoptrie ; Apical prominence : Proéminence apicale ; Polar rings : anneau polaire ; Microneme : Micronème ; Dense granules : granules denses ; Microtubules : microtubules ; Mitochondrion : mitochondrie ; Plastid : apicoplaste ; Nucleus : noyaux ; Merozoïte coat : manteau mérozoïtaire

L'ensemble des organelles du mérozoïte se concentre majoritairement vers l'extrémité apicale du parasite.

Les rhoptries sont au nombre de deux, en forme de poire avec la pointe dirigée vers l'extrémité du parasite. Elles mesurent 650 nm de long pour 300 nm de large à leur base. Elles apparaissent hyperdenses en MET. Leurs extrémités constituent un canal pour le relargage du contenu des rhoptries. Celles-ci contiennent un mélange de diverses protéines impliquées dans l'invasion du GR (97) (98). Les rhoptries présentent un aspect fortement réfringent en MET. Les micronèmes mesurant 120 nm x 40 nm sont regroupés autour du conduit des rhoptries et s'ouvrent vers l'extrémité des rhoptries (91) (97).

Les micronèmes et les rhoptries relarguent leur contenu lors de la phase d'invasion du globule rouge. Ils permettent la constitution d'une fosse dans la membrane du globule rouge pour permettre la pénétration du mérozoïte. Ils aident également à la formation d'une membrane

qui contient le parasite et qui est appelée vésicule parasitophore. Celle-ci persiste durant tous les stades parasitaires intra-érythrocytaires (91) (99) (100) 101).

On retrouve une dernière classe d'organites spécialisés qui se regroupent à la partie apicale : les granules hyperdenses (102). Ce sont des corps arrondis de 80 nm, contenant également diverses protéines impliquées dans le processus d'invasion. Après la phase d'invasion du GR, ces granules se condensent vers l'extrémité apicale, relarguant leur contenu dans la vacuole parasitophore formée. Les protéines relarguées aideraient à la constitution d'un réseau de transport protéique, et à la reconsolidation de la membrane du GR après la pénétration du parasite (91) (102). Ils marquent la transition du mérozoïte vers la forme anneaux ou trophozoïte jeune (91) (102).

Autres organelles :

La forme du mérozoïte et des organelles est étroitement assurée par son cytosquelette (96) A la base du mérozoïte on retrouve le noyau, entourée d'une enveloppe nucléaire pourvue de pores. La chromatine est homogène sans nucléole discernable (Figure 20) (91).

Le mérozoïte mature, possède une mitochondrie et un apicoplaste issus du développement du réseau mitochondriale et apicoplastique du schizonte mère. En effet, ces deux organelles ne peuvent être synthétisées *de novo* à partir du génome parasite (103).

L'apicoplaste, un organite définissant le groupe des *Apicomplexa* est dérivé du chloroplaste de plante responsable de la photosynthèse, fonction perdue chez l'apicoplaste. Les fonctions de l'apicoplaste sont partiellement connues. Il possède trois à quatre membranes, un ADN double brin circulaire procaryotique codant pour son propre génome (73) (77) (104) (105) (106). La mitochondrie et l'apicoplaste sont des produits de l'endosymbiose. Comme la mitochondrie, l'apicoplaste est doté de ribosomes procaryotes. Les apicoplastes assurent des fonctions importantes de synthèses de métabolites secondaires chez *Plasmodium sp* dont la synthèse des protéines et des acides gras de type II, la synthèse du mévalonate, la synthèse des isoprénoides et enfin de l'hème (73) (78) (107). La biosynthèse d'acide gras est une réaction importante pour le parasite qui lui permet la croissance de ses membranes lipidiques, qui sont indispensables pour les multiples divisions cellulaires du parasite. Il apparait par ce mécanisme que l'apicoplaste est un organite indispensable à la division cellulaire des *Apicomplexas*. Lors du passage des trophozoïtes au stade schizonte, l'activité apicoplastique augmente. Les futurs mérozoïtes formés dans le schizonte développent leurs propres apicoplastes qui permettent la poursuite du développement du mérozoïte jusqu'à la maturation complète de ce dernier avant d'aller pouvoir infecter de nouveaux érythrocytes. Le ciblage de cet organite par certaines

thérapies anti-plasmodiales démontre l'importance de cet organe pour la suite du développement parasitaire.

Dans l'espace intracellulaire du mérozoïte, on retrouve de très nombreux microgranules hyperdenses en MET (Figure 20). Il s'agit de ribosomes, ils sont présents en grande quantité afin d'assurer une synthèse protéique massive et rapide dès la phase d'invasion dans le globule rouge achevée jusqu'au passage vers la forme anneau (91). En revanche, le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi sont peu développés et visibles chez les mérozoïtes matures.

A l'extrémité postérieure du mérozoïte, on retrouve parfois une petite saillie qui correspond à un point d'attache avec le schizonte mère (103).

1.3.2.2 Le trophozoïte jeune

Après invasion du GR, le mérozoïte s'aplatit sous forme annulaire et discoïdale. On parle alors de trophozoïte jeune ou anneau (Figure 22) (91)

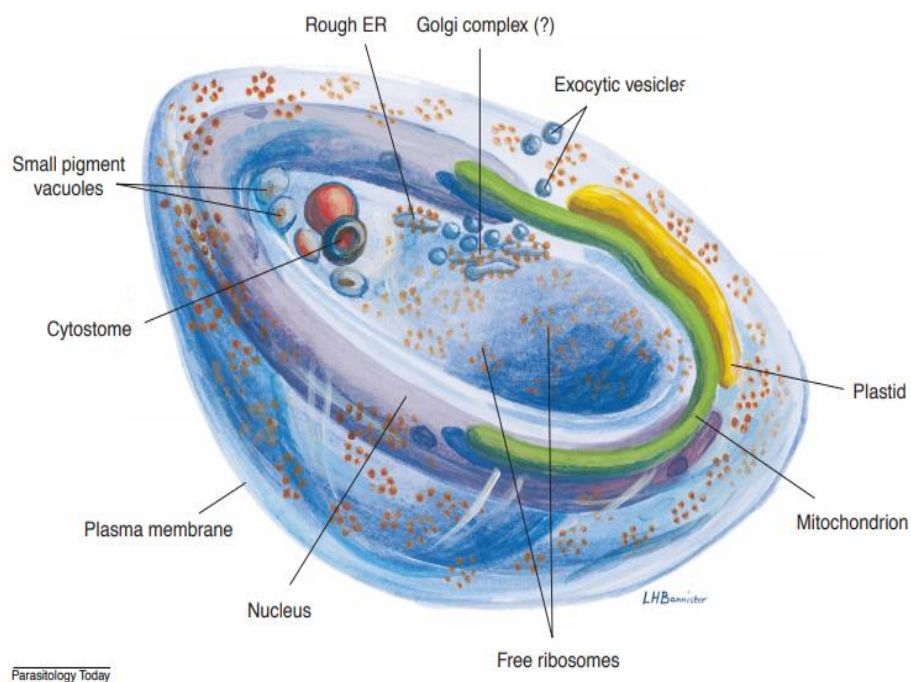


Figure 22 : Représentation schématique d'un trophozoïte jeune avec visualisation des organelles (91)

Légende : Nucleus : noyau ; Free ribosomes : ribosomes libres ; Mitochondrion : mitochondrie ; Plastid : apicoplaste ; Exocytic vesicles : vésicules exocytiques ; Golgi complex : appareil de Golgi ; Rough ER : réticulum rugueux ; Small pigment vacuoles : petit pigment vacuolaire ; Cytostome : cytostome ; Plasma membrane : membrane plasmique

Le parasite synthétise la vacuole parasitophore qui va contenir le parasite, cette dernière est étroitement associée avec la membrane externe du parasite. Au cours de ce stade la taille du parasite atteint 2-3 μm de diamètre par 0.5 μm de profondeur (108).

La périphérie du cytoplasme est plus épaisse et va abriter les principaux organites dont le noyau, la mitochondrie et l'apicoplaste (Figure 22) (102). La partie centrale du cytoplasme sera pauvre en organites (Figure 22 et 23) (102). La visualisation de la morphologie dite en bague à chaton ou anneau en microscopie optique s'explique par la coloration au Giemsa du noyau et du cytoplasme, la vacuole parasitophore restant incolore (102).

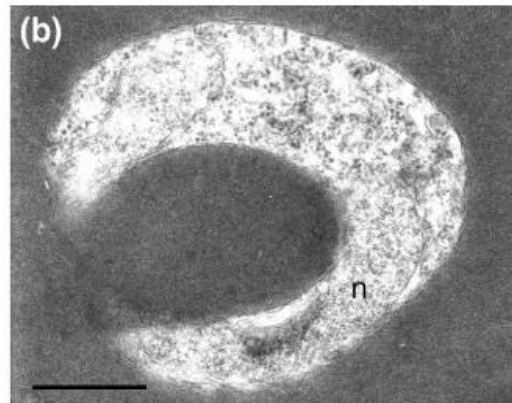


Figure 23 : Section transversale d'un trophozoïte jeune en anneau en MET (102)

Légende : n : noyau ; la barre noire représente 5 µm

Peu après l'invasion du GR par le mérozoïte, celui-ci de forme ovoïde va s'aplatir puis se creuser sous forme de tasse ou de bol comme en attestent les images par tomographie (Figure 24) (103) (108). Les raisons de cette morphologie en bol ne sont pas totalement élucidées. Une des hypothèses serait que le parasite pourrait par ce procédé accroître sa surface, limitée à la base par l'encombrement de l'hémoglobine du GR. L'accroissement de sa surface pourrait favoriser les mécanismes de pinocytose du parasite impliqué dans l'ingestion de l'hémoglobine (108).

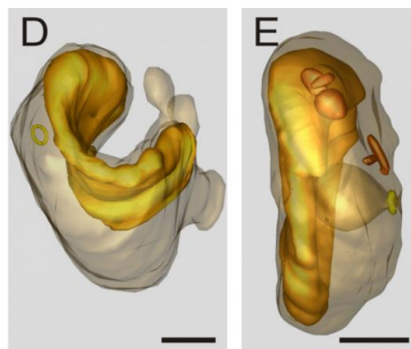


Figure 24 : Images de *Plasmodium falciparum* au stade anneau parasitaire observées et reconstruites par tomographie (108)

Légende : noyaux colorés en doré ; anneau cytotomale en jaune ; invagination cytotomale jaune transparent ; vésicules endocytiques en orange ; barre noire d'échelle 1 µ

Le noyau peut être de forme polymorphe, adoptant des formes allant d'une saucisse allongée à une portion d'anneau (91) (109). Près du noyau, on voit une accumulation de

vésicules, de réticulum endoplasmique lisse et rugueux qui suggère la présence d'un appareil de Golgi à proximité (Figure 23) (91) (109) (103). La mitochondrie et l'apicoplaste vont commencer à se développer mais ils restent étroitement liés à ce stade (103).

Au travers d'un organite appelé cytostome retrouvé en un seul exemplaire à ce stade, le parasite va commencer à se nourrir à partir du contenu du GR (110). Sur la figure 25, on peut discerner le cytostome (Ct) de *Plasmodium falciparum*, visualisable sous la forme d'une invagination dans le parasite et cerné par deux parois latérales au fort contraste aux électrons (Figure 25 sous-section B et C) (108).

On retrouve des vésicules pigmentaires appelées corps osmiophiles à proximité du cytostome. En MET, ils présentent un aspect de petite vacuole noire très dense aux électrons (102).

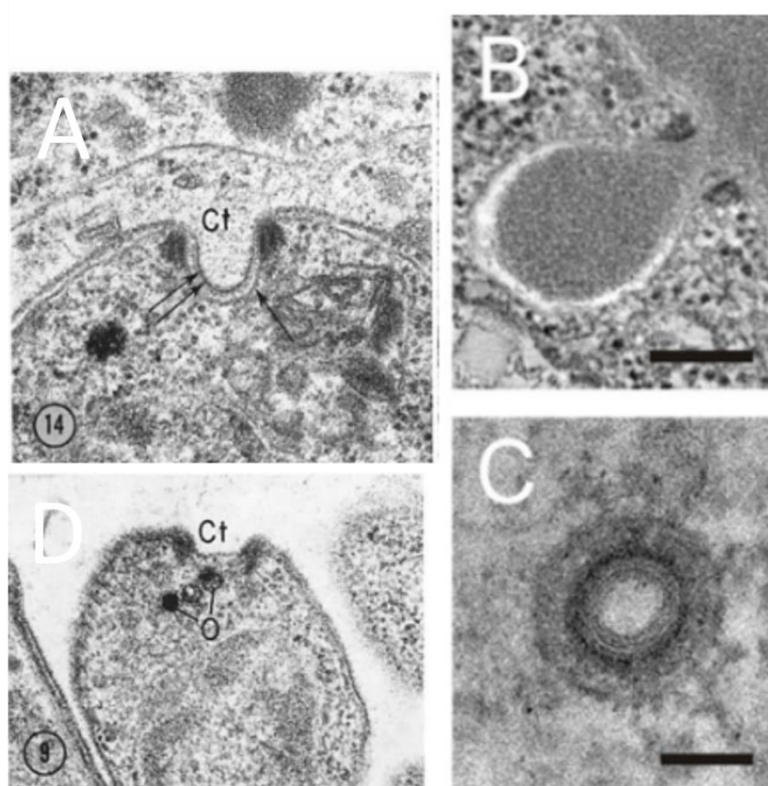


Figure 25 : Images en MET de cytostomes et de corps osmiophiles de *Plasmodium falciparum* (108) (110)

Légende : A : section longitudinale au travers d'un cytostome ; B : section longitudinale au travers d'un cytostome avec vésicule endocytique ; C : section transversale au travers d'un cytostome ; D : section longitudinale au travers d'un cytostome avec corps osmiophile

Ct : cytostome ; O corps osmiophile ; Barre noire d'échelle en B : 200 nm ; C :100 nm ; A, D grossissement x 50 000

Le cytostome est une structure retrouvée chez de nombreux protozoaires (111). Au stade précoce du trophozoïte, le cytostome est inactif. Puis celui-ci va commencer à former des

vésicules endocytiques qui s'accumulent dans le parasite (108). Durant ce stade, le parasite est dépourvu de vacuole digestive, et l'absorption de nutriments se fait directement par l'acidification et la digestion du contenu de ses multiples petites vésicules endocytiques (108). Au stade très précoce de l'anneau, le parasite commence par ingérer du cytosol de l'érythrocyte par le cytostome. Puis lors de la maturation, le parasite va s'attaquer à l'hémoglobine (Hb) érythrocytaire (103) (108). La digestion de l'hémoglobine est cruciale pour le parasite. Elle permet entre autres de fournir des acides aminés et de libérer de la place dans le globule rouge.

La digestion de l'Hb constitue toutefois un problème pour le parasite en entraînant la formation d'hématine toxique. *Plasmodium sp* est capable de neutraliser ce dérivé toxique en la complexant sous forme de cristal insoluble appelée hémozoïne (112). Au stade anneau, l'hémozoïne est ainsi condensée dans plusieurs petites vésicules endocytiques sous forme de microcristaux denses. Ils sont visualisables en MET dans les vésicules endocytiques comme fortement réfringents (Figure 26) (113).

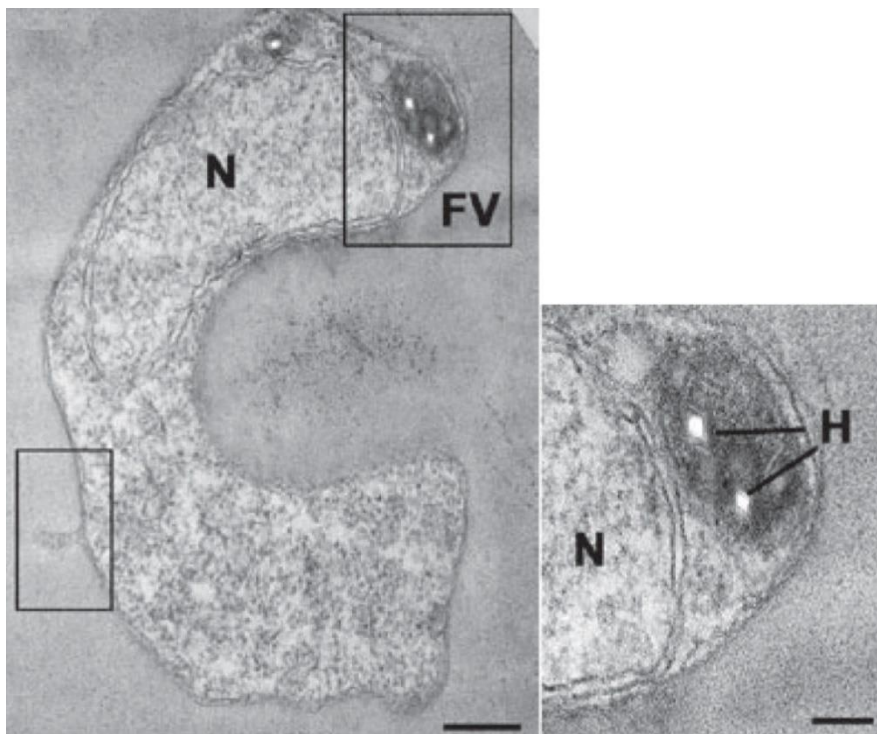


Figure 26 : Images en MET d'un trophozoïte jeune de *Plasmodium falciparum* et de cristaux d'hémozoïnes (113)

Légende ; N : noyaux ; FV : vésicule digestive ; H : cristaux d'hémozoïnes ; barre noire d'échelle figure gauche : 200 nm, figure de droite : 100nm

1.3.2.3 Le trophozoïte mature

A ce stade, on voit apparaître des modifications importantes aussi bien chez le parasite, que chez le GR qui l'héberge.

A. Modification du parasite :

Pour commencer, le parasite a augmenté en taille et son diamètre est de l'ordre de 4 μm . La surface et le volume du trophozoïte s'agrandit avec la formation de renflements et d'invaginations tubulaires profondes. Cette modification s'explique par le développement des différentes structures intracellulaires (Figure 27).

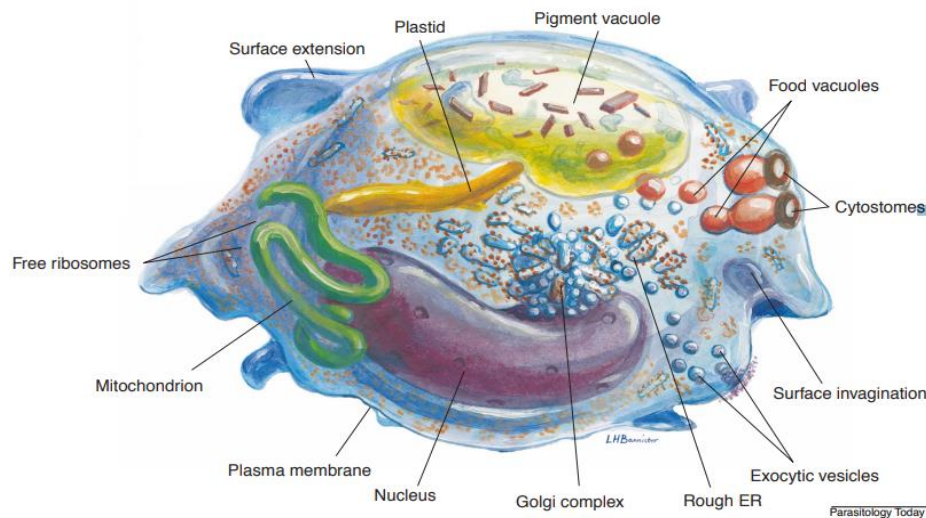


Figure 27 : Représentation schématique d'un trophozoïte avec visualisation des organelles (91)

Légende : free ribosomes : ribosomes libres ; mitochondrion : mitochondrie ; plasma membrane : membrane plasmique ; nucleus : noyau ; Golgi complex : complexe de Golgi ; rough ER : reticulum rugueux ; exocytic vesicles : vésicule exocytiques ; surface invagination : invagination de surface ; food vacuole : vacuole digestive ; pigment vacuole : vacuole pigmentaire ; plastid : apicoplaste ; surface extension : extension de surface

La croissance du parasite est dépendante de l'absorption de nutriments issus du GR. Les besoins croissants sont satisfaits par une multiplication des cytostomes actifs. Les différents cytostomes continuent de produire des vésicules endocytiques qui par la suite vont transporter leur contenu, l'hémoglobine, vers la vacuole digestive (VD) (Figure 28) (91) (102) (108).

La VD adopte en MET un aspect intérieur plus clair que ses précurseurs. Elle est délimitée, comme les vésicules endocytiques, par une seule membrane en une seule couche.

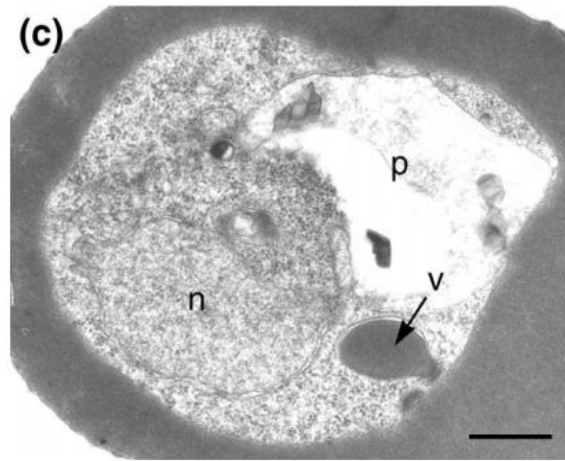


Figure 28 : Image en MET d'un trophozoïte mature de *Plasmodium falciparum* et de la vacuole digestive (91)

Légende : n : noyaux, p : vacuole digestive, v : vésicule endocytique en formation à partir d'un cytostome : échelle barre noire 0.5 µm

L'apparition de cette VD principale marque le passage du parasite du stade trophozoïte jeune au stade trophozoïte âgé. Cette fusion donne lieu au regroupement des cristaux d'hémozoïne, facilement visualisables en MET sous la forme de cristaux à fortes réfringence (Figure 29) (91) (102) (108) (113).

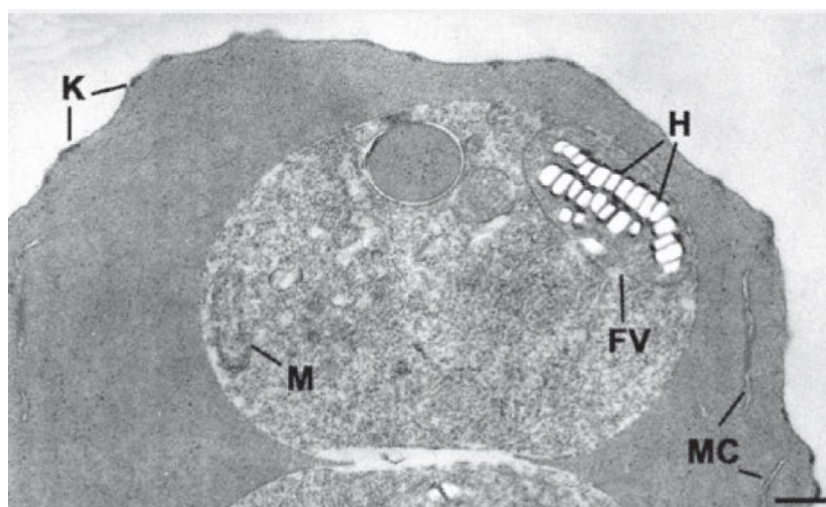


Figure 29 : Images en MET d'un trophozoïte mature de *Plasmodium falciparum* et des cristaux d'hémozoïne dans la VD (113)

Légende ; FV : vacuole digestive ; M : mitochondrie ; MC : tache de Maurer ; K : knobs ; barre d'échelle barre noire : 200 nm

A ce stade parasitaire, on voit l'apparition d'un acidocalcisome en MET, (triangle blanc) d'aspect blanc en MET, il mesure environ 50nm de diamètre (Figure 30) (103) (108) (114). Cette organelle est commun au genre *Apicomplexa* et aux bactéries. D'après Lourido et

al. son rôle principal chez le parasite serait le stockage des cations. Il tient une place très importante dans le stockage du calcium intracellulaire et du phosphore (114) (115). D'après la littérature, il est retrouvé libre dans le parasite au stades trophozoïte et schizonte.

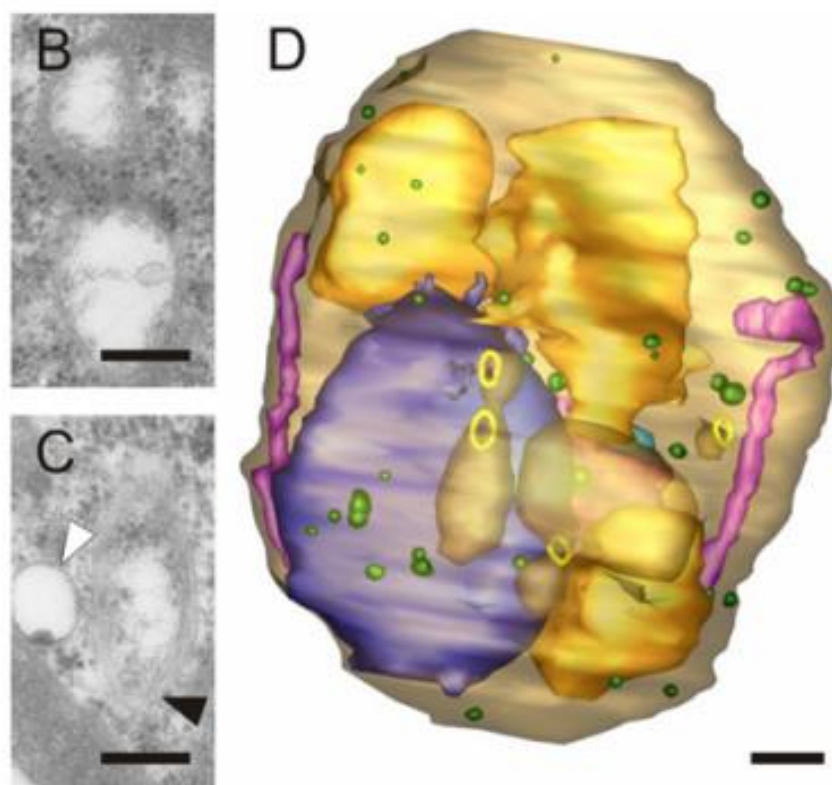


Figure 30 : Images en MET d'un trophozoïte mature de *Plasmodium falciparum* et d'un acidocalcisome, apicoplaste et mitochondrie (102) (103) (108)

Légende : B : image de mitochondrie ; C : image d'un acidocalcisome et d'un apicoplaste ; D : reconstruction d'un trophozoïte mature par tomographie à électrons

Flèche noire apicoplaste ; flèche blanche acidocalcisome ; échelle barre noire D 500 nm ; 4 noyaux colorés en doré, rond coloré jaune : cytosome, vésicule cytosomale coloré en jaune pâle attaché au cytosome, mitochondrie colorée en rose, acidocalcisome coloré en vert ; échelle barre noire B and C 200 nm

On retrouve une augmentation importante des réticulums endoplasmiques, correspondant à une augmentation de la synthèse protéique (91) (102) (103). A proximité du noyau se développe le complexe de Golgi : il n'est pas strictement délimitable, et se devine par la formation de vésicules tubulaires en grand nombre à proximité du noyau (Figure 31) (91) (103) (116).

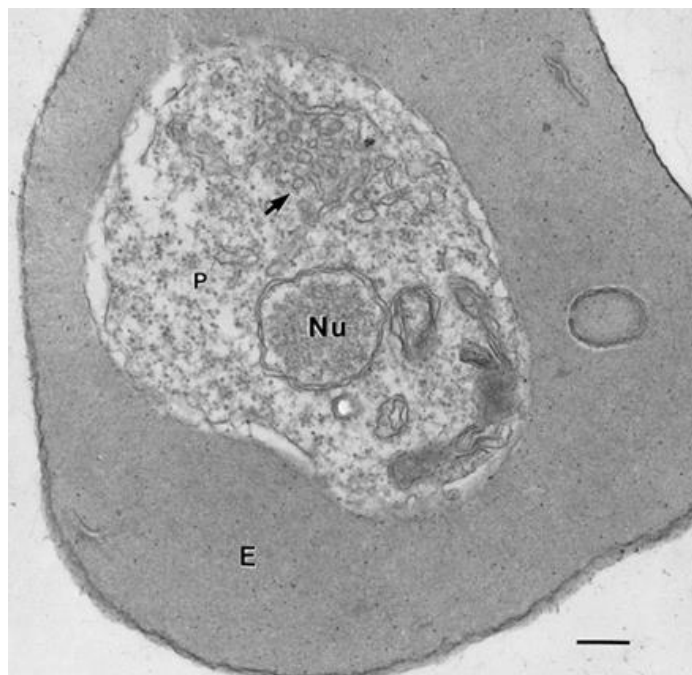


Figure 31 : Image en MET d'un érythrocyte infecté par *Plasmodium falciparum* au stade trophozoïte mature et d'un appareil de Golgi (116)

Légende : Flèche noire : formation de vésicules et de tubules correspondant à un appareil de Golgi ; Nu : noyaux ; P : parasite ; E : érythrocyte ; barre noire d'échelle 0.222 μ m

On observe un développement du réseau mitochondrial et apicoplastique toujours en lien avec l'augmentation de l'activité parasitaire. Il est ainsi plus facilement visualisable en MET à ce stade qu'au stade anneau. L'observation en MET a permis de montrer que la mitochondrie possède deux membranes, tandis que l'apicoplaste possède trois à quatre membranes (Figure 30 image C) (102) (103). La mitochondrie possède une forme rubanée en bâtonnet mais son observation en MET se présente le plus souvent sous forme circulaire et consiste en une coupe transversale du bâtonnet (Figure 30, image B) (103).

Il existe une relation étroite entre le développement de la mitochondrie et de l'apicoplaste. A ce stade parasitaire, l'allongement de la mitochondrie est suivi de près par la ramification de l'apicoplaste qui croise la mitochondrie en plusieurs points. Cette relation a pu être objectivée par microscopie à fluorescence (73). A ce stade, la mitochondrie et l'apicoplaste sont le plus souvent à proximité de la vacuole digestive (91).

A ce stade, on peut retrouver des corps osmiophiles décrits précédemment chez le mérozoïte. Au stade trophozoïte mature ces corps osmiophiles sont retrouvés à proximité de la vacuole digestive (102).

La transition vers la forme schizonte est marquée par la division de l'unique noyau du trophozoïte mature.

B. Modification du globule rouge :

Lors de son cycle intra-érythrocytaire, *P. falciparum* génère des modifications importantes du GR. Le parasite synthétise et exporte ses propres protéines dans le cytoplasme érythrocytaire et au niveau du cytosquelette et de la membrane du GR (102) (103). L'expression de protéines parasitaires sur la membrane du GR va participer à sa déformation. (103) (117)

Parmi ces protéines on retrouve les Knobs, qui consistent en des protubérances de 30 à 40 nm de hauteur pour 90 nm de diamètre (Figure 32 et 33) (102) (103). L'une des protéines majeures constituant ces protubérances est la protéine Knobs Associated Histidine Rich Protein (KAHRP), qui a la capacité d'interagir avec les protéines du cytosquelette du GR (102) (118). Ces protubérances sont un réseau d'interactions entre les protéines de *P. falciparum* et les protéines du cytosquelette membranaire de l'érythrocyte. En MET, il est possible de les visualiser dès le stade trophozoïte jeune jusqu'au stade schizonte.

Chez *Plasmodium falciparum* les Knobs vont exporter des antigènes à la surface du GR tels que la protéine d'adhésion *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1 (PfEMP-1), localisée au sommet des protubérances et qui joue un rôle dans la séquestration des érythrocytes.

La protéine PfEMP-1 joue un rôle important dans la physiopathologie du paludisme chez *P. falciparum* car elle participe à la physiopathologie des formes graves. A noter que *in vitro* les parasites maintenus en culture sur une longue durée peuvent présenter une perte d'expression des protéines KAHRP et peuvent donc présenter une absence de Knobs (119).

L'export de ces protéines de la vacuole parasitophore du parasite vers la membrane de l'érythrocyte est effectué par une machinerie complexe de transport et de tri des protéines au sein d'une cellule qui est dépourvue de mécanismes de synthèse et d'export des protéines.

L'ancrage de ces protéines à la surface se fait à partir de la membrane de la vacuole parasitophore. Elles sont ensuite acheminées du cytoplasme à la surface de l'érythrocyte par les taches de Maurer ou par des vésicules denses, qui sont indispensables à la translocation des protéines à la surface de l'érythrocyte parasité. En MET, ces vésicules denses mesurent 100 nm et possèdent une membrane dense en électrons avec un cytosol clair (Figure 32) (103) (108). Elles ont la faculté de rester latentes dans le cytoplasme de l'érythrocyte et de former des chaînes ou des amas. (103) (120).

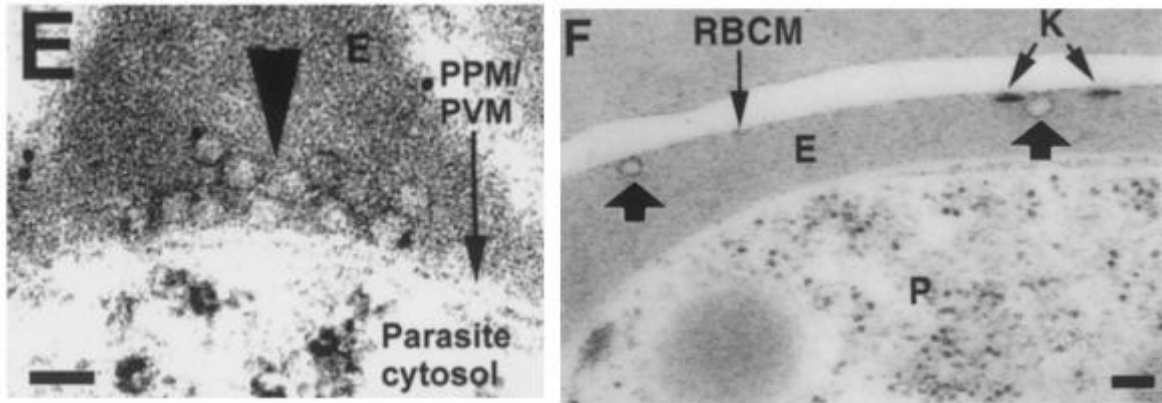


Figure 32 : Images en MET de *Plasmodium falciparum* au stade trophozoïte avec visualisation des Knobs et des vésicules denses (120)

Légende : barre noire d'échelle : 0.222 μm ; flèche noire : formation de vésicules denses ; Nu : noyaux, P : parasite, E : érythrocyte, RBCM : membrane érythrocytaire, K : Knobs ; PPM/PVM : vacuole parasitophore

Les taches de Maurer ont une forme d'assiette plate. En MET, elles prennent la forme de bâtonnets à paroi fine et dense aux électrons et dont l'espace intérieur est clair (Figure 33 A, B) (92) (102) (103). Elles mesurent 500 nm de diamètre et 30 nm de profondeur (Figure 33, A). On peut les observer de façon caractéristique en groupe sous la forme de piles d'assiettes (Figure 33, B) (92) (103) (121).

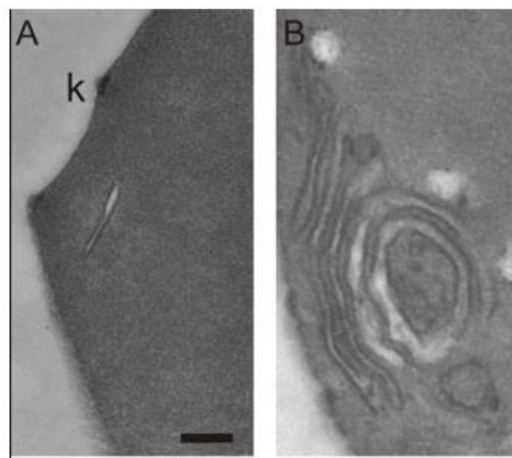


Figure 33 : Images en MET de *Plasmodium falciparum* avec visualisation des Knobs et des taches de Maurer (103)

Légende : A : observation des taches de Maurer sous forme d'une lamelle simple ; B : Taches de Maurer en pile d'assiettes

k : Knobs ; barre noire d'échelle (A-B) 200 nm

L'origine de la synthèse des taches de Maurer ainsi que leur rôle n'est pas encore bien compris, mais une des hypothèses serait qu'elles proviendraient de la vacuole parasitophore ou du réseau tubulo-vésiculaire (122).

On retrouve parfois associées aux taches de Maurer, des structures tubulo-vésiculaires aussi appelées tether (Figure 34 images C, D, E) (103) (123). En MET, elles prennent l'aspect de connexions tubulaires denses en électrons et d'un diamètre d'environ 30 nm. Elles permettent l'ancrage des taches de Maurer à la membrane érythrocytaire, on peut également les retrouver libres dans le cytoplasme de l'érythrocyte (123).

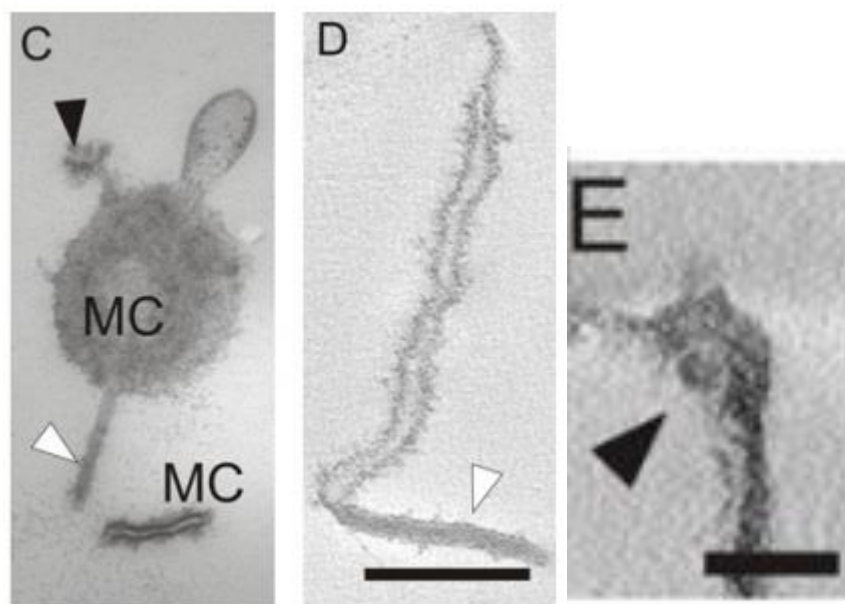


Figure 34 : Images en MET de *Plasmodium falciparum* et des structures taches de Maurer et tethers (103)

Légende : Flèche noire : vésicules, ; flèches blanches : Tether ; Barre noire d'échelle = 200 nm en C et D, 100 nm

1.3.2.4 Le schizonte

Le stade schizonte est défini par la présence de plusieurs noyaux au sein du parasite et qui fait suite à plusieurs divisions nucléaires répétitives au sein de ce dernier. La division nucléaire chez *Plasmodium sp* est le fruit d'une préparation métabolique complexe et intense. Les premières divisions surviennent dans un intervalle de 38 à 48h post invasion pour *P. falciparum* (91).

Avec la résolution qu'offre la MET, le schizonte est défini comme le stade où les cellules filles ou pré-mérozoïtes sont différenciables et où les structures qui leurs sont spécifiques deviennent visibles au sein du schizonte (91) (124). On distingue en MET plusieurs sous-stades de schizontes selon le nombre de mérozoïtes et leur stade de maturation. Mais il reste difficile de définir clairement le stade visualisé sur une coupe en MET, car celle-ci ne permet pas de visualiser l'ensemble des mérozoïtes présents au sein du schizonte observé.

Depuis le stade trophozoïte mature, le parasite continue de grandir et doit gagner de l'espace au sein du GR. Pour ce faire, le parasite continue d'ingérer du cytosol de l'érythrocyte, en consommant près de 80% de l'hémoglobine (125). En conséquence la vacuole digestive s'agrandit et se densifie, et la proportion en hémozoïne continue proportionnellement à augmenter (125).

L'exportation des protéines parasitaires à la surface de l'érythrocyte se poursuit jusqu'à la fin de vie du schizonte, ce qui entraîne de ce fait une augmentation de l'expression des Knobs. De plus, la surface de l'érythrocyte se déforme encore au fur et à mesure de la maturation du parasite (126).

On compte en moyenne quatre divisions cellulaires du noyau pour *P. falciparum*, conduisant à la formation de 16 noyaux au total. Cependant, il peut y avoir jusqu'à 20 mérozoïtes par schizonte chez *P. falciparum* en raison de divisions asynchrones supplémentaires ou non (91) (92). Cette division est endo-mitotique comme chez la plupart des procaryotes et ne donne pas lieu à une division cellulaire du parasite à la suite de l'obtention des deux noyaux nucléaires (92) (103).

On commence à observer en MET les premières structures mérozoïtaires à l'arrivée au stade schizonte, dès 4 noyaux. Parmi celles-ci, on observe une proéminence apicale et les structures précurseurs des rhoptries, indispensables au futur processus d'invasion du mérozoïte libéré (Figure 35 A, B).

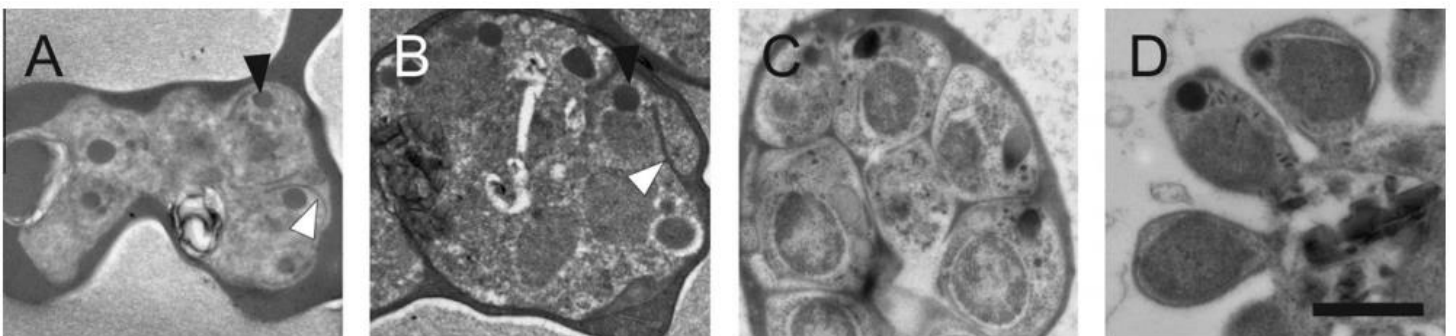


Figure 35 : Images en MET d'un érythrocyte infecté par *Plasmodium falciparum* et des stades finaux de la schizogonie (103)

Légende : A : Schizonte à 4 noyaux immatures ; B : Schizonte à 8 noyaux immatures ; C : Schizonte érythrocytaire à 16 noyaux immatures ; D : Schizonte éclaté à 16 noyaux matures

Flèche noire : pré-rhoptrie ; flèche blanche : invagination pré mérozoïtaire de la membrane parasitophore et proéminence apicale ; barre noire d'échelle A, B, C, D = 1 μ m

A partir de 4/8 noyaux, la membrane parasitaire commence à former des invaginations (Figure 35, A, B). A ce stade, les noyaux et les structures immatures associées se déplacent vers la périphérie du parasite. Ils vont être piégés par les invaginations de la membrane de la vésicule parasitophore.

De plus, on observe une prolifération importante du réticulum endoplasmique rugueux, des ribosomes libres, le développement du réseau mitochondrial et de l'apicoplaste et l'accumulation de grandes vacuoles lipidiques dans le cytoplasme du parasite (103). Les vacuoles lipidiques serviront à la formation et à la fermeture des invaginations pour la constitution de la membrane de chaque futur mérozoïte (Figure 36) (103). En MET, elles se présentent comme des zones blanches de faible densité en électrons (Figure 36).

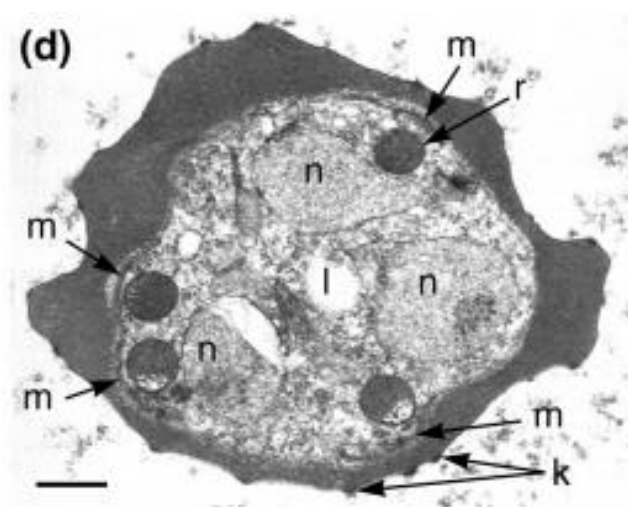


Figure 36 : Image en MET d'un schizonte de *Plasmodium falciparum* à 8 /16 noyaux (91)

Légende : m : mérozoïtes en maturation ; n : noyau ; r : rhoptries ; l : vacuole lipidique ; k : knobs ; barre d'échelle noire 0.5 μ m

Les structures propres au mérozoïte poursuivent leur développement dans un ordre précis. Les premières structures à se différencier et à s'assembler sont les structures apicales. Dès le stade 4 noyaux on voit apparaître des vésicules enrobées émanant du noyau nucléaire (Figure 37) (98). Ces vésicules vont s'assembler pour former un unique appareil de Golgi discoïdal à proximité du noyau. De l'appareil de Golgi on voit la sécrétion de nouvelles vésicules. Ces vésicules vont soit fusionner et donner naissance aux rhoptries, soit rester individuelles et former des micronèmes ou des granules denses (Figure 36 et 37 et 38) (98) (127).

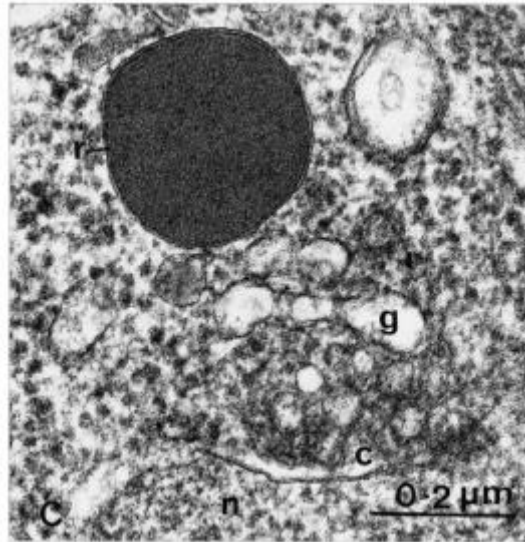


Figure 37 : Image en MET d'un schizonte *Plasmodium falciparum* 8/16 noyaux et des structures appareil de Golgi (91) (98)

Légende : c : vésicules enrobées ; g : appareil de Golgi ; n : noyau, r : rhoptries ; barre noire d'échelle =0,2 μm

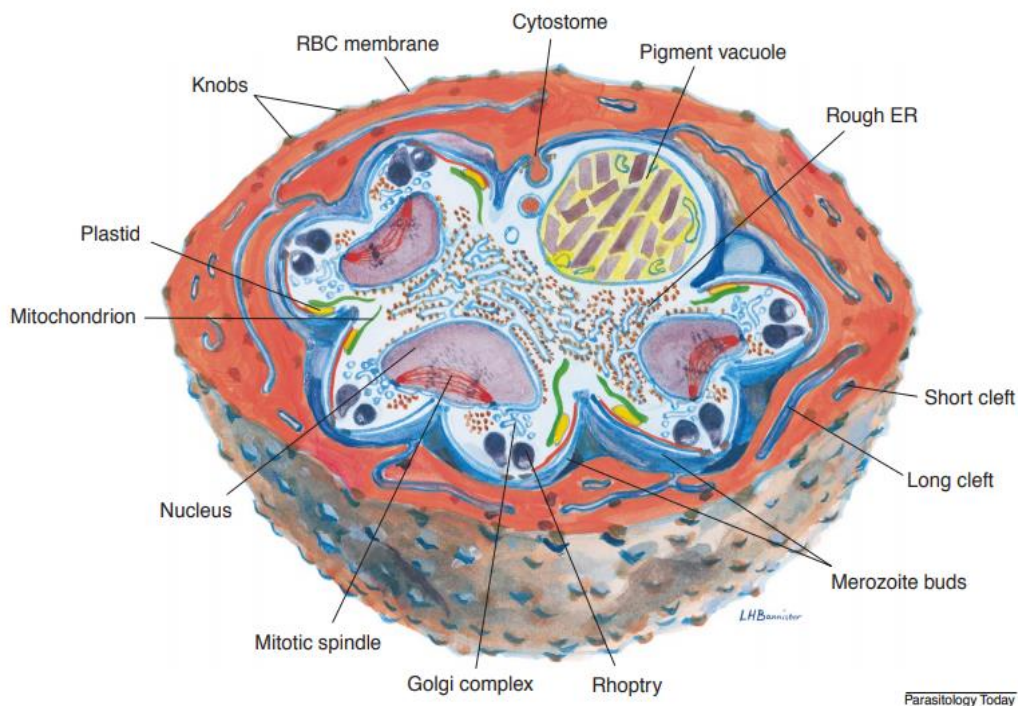


Figure 38 : Représentation schématique d'un schizonte 8 / 16 noyaux avec visualisation des organelles (91)

Légende : Nucleus : noyaux ; Mitotic spindle : fuseau nucléaire ; Golgi complex : Appareil de Golgi ; Rhoptry : Rhoptrie ; Mérozoïte buds : bourgeon mérozoïtaire ; Long cleft : longue fente ; Short cleft : Petite fente ; Rough ER : Réticulum rugueux ; pigment vacuole : pigments vacuolaires ; Cytostome : Cytostome ; RBC membrane : membrane érythrocytaire ; Knobs : Knobs ; Plastid : apicoplaste ; Mitochondrion : Mitochondrie.

Au stade 16 noyaux, le réseau mitochondrial et apicoplastique est développé au maximum (Figure 39, stade E). Le passage vers le stade schizonte 16 noyaux matures est marqué par la séparation de l'appareil mitochondrio-apicoplastique juste avant que les cellules filles ne soient définitivement individualisées (Figure 39, stade F) (128). Chaque futur mérozoïte est ainsi pourvu de son propre appareil mitochondrio-apicoplastique et de toute la machinerie cellulaire nécessaire à l'invasion d'un nouvel érythrocyte.

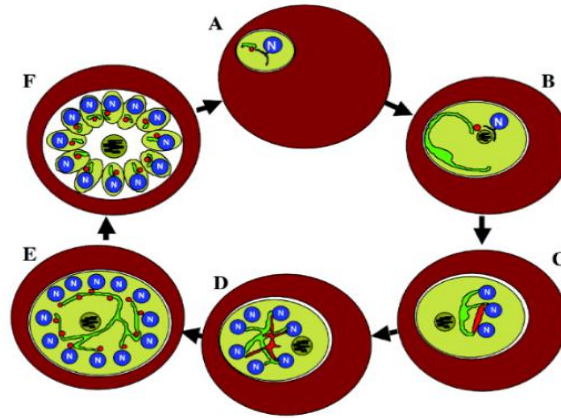


Figure 39 : Schéma du développement du réseau mitochondrial et apico-plastique au cours du développement de *Plasmodium falciparum* (128)

Légende : A : stade anneau ; B, stade trophozoïte jeune ; C : stade trophozoïte âgé ; D : stade trophozoïte mature ; E : stade schizonte immature ; F : stade schizonte mature ; N : noyau

L'apicoplaste : représenté en rouge ; la mitochondrie : représenté en vert

Chaque mérozoïte est alors bien différencié avec une membrane externe issue de la vacuole parasitophore. L'ensemble des mérozoïtes est maintenu au sein de l'érythrocyte par la vésicule parasitophore qui joue le rôle de sac. Les mérozoïtes sont reliés au corps résiduel de la vacuole digestive par un anneau polaire de constriction à leur base.

Au cours de l'étape de maturation des organelles mérozoïtaires, et en particulier de toute la machinerie pour l'invasion érythrocytaire, les rhoptries vont présenter différents aspects en MET (Figure 40). On observe la partie basale (b) d'une rhoptrie qui est dense en électron, et une extension (d) qui correspond à la partie apicale de la rhoptrie qui est moins dense aux électrons (Figure 40) (98).

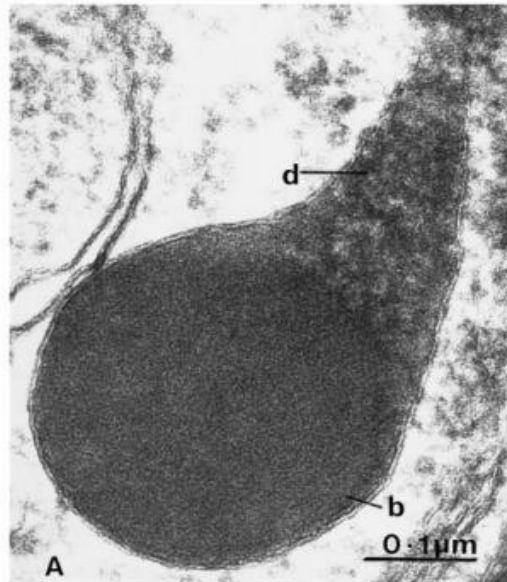


Figure 40 : Image en MET d'une rhoptrie en maturation de *Plasmodium falciparum* (98)

Légende : b partie basale ; d : extension de la rhoptrie ; barre d'échelle noire 0.1 μm

Lors de cette étape de maturation, on voit également l'apparition des anneaux polaires à la partie apicale du mérozoïte en devenir (98). Enfin une fois matures, les mérozoïtes vont sécréter divers enzymes par leur extrémité apicale qui vont faire éclater l'érythrocyte. Ils sont libérés dans la circulation sanguine de l'hôte et vont pour pouvoir engendrer un nouveau cycle parasitaire par l'invasion d'un nouveau GR (91) (98) (103).

PARTIE 2 : ÉTUDE de *Plasmodium*
***falciparum* en microscopie électronique à**
transmission soumis à la doxycycline

2.1 Matériel et méthode

Au cours des travaux pratiques réalisés dans cette thèse, nous avons employé plusieurs matériels spécifiques à la culture cellulaire et à la microscopie électronique à transmission. Les méthodes et la liste des matériels employés sont détaillées et séparées dans les 2 parties correspondantes.

2.1.1 Culture *in vitro* de *Plasmodium falciparum*

A) Matériels employés

- ❖ Sérum humain : produit dérivé sanguin issu de don sous convention avec l'établissement français du sang (EFS)
- ❖ Sang humain : sang de groupe A+ issu de don sous convention avec l'EFS
- ❖ Parasite : clone 3D7 de *Plasmodium falciparum* (don du Centre national de référence du paludisme, unité Parasitologie et Entomologie, Institut de recherche biomédicale des armées, IHU Méditerranée Infection)
- ❖ Milieu de lavage : milieu Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI)-1640 (Gibco, Life Technologies)
- ❖ Milieu de culture 10% sérum humain (RPS10) : milieu RPMI-1640 (Gibco, Life Technologies) supplémenté à 10 % en sérum humain.
- ❖ D-Sorbitol : 10g de D-sorbitol poudre diluée dans 200 millilitres (mL) d'eau ultra pure stérile et filtrée sur micropore à 0.22 µm

B) Description du protocole de culture cellulaire :

La méthode de culture *in vitro* de *Plasmodium* durant sa phase sanguine a été mise au point en 1976 par Trager et Jensen (1976) (129). Toutes les étapes de la culture jusqu'à la fixation des parasites au glutaraldéhyde 2% se sont déroulées sous hotte chimique de type sorbonne au laboratoire P3 module 4 NSB3, au sein des locaux de l'IHU Méditerranée.

La souche employée lors de ces travaux est issue de la re-viabilisation d'une souche caractérisée et cryoconservée à -80°C au sein des locaux du CNR du Paludisme.

Cette souche 3D7 de *Plasmodium falciparum* a été caractérisée au niveau de sa sensibilité aux antipaludéens *in vitro* par le CNR Paludisme.

Les CI50s caractéristiques de cette souche sont mentionnées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 5 : CI50s de la souche 3D7

Molécule	Moyenne ±Ecart type		
	2018	2019	2020
Chloroquine (nM)	532 ± 161	545 ± 130	402 ± 130
Quinine (nM)	545 ± 125	507 ± 58	537 ± 63
<i>Monodéséthylamodiaquine</i> (nM)	146 ± 33	126 ± 22	130 ± 15
Luméfantine (nM)	14.7 ± 1.8	12.4 ± 4.1	13.4 ± 4.1
Dihydroartémisine (nM)	2.5 ± 0.7	2.0 ± 0.6	2.0 ± 1.0
Doxycycline (µM)	10.6 ± 2.5	10.9 ± 1.6	12.2 ± 2.4
Méfloquine (nM)	21.2 ± 6.2	22.9 ± 4.6	21.7 ± 9.9
Pipéraquine (nM)	58.1 ± 7.5	50.5 ± 5.7	50.9 ± 8.9
Pyronaridine (nM)	16.9 ± 3.9	14.0 ± 4.7	12.5 ± 1.2
Artésunate (nM)	2.1 ± 0.6	1.4 ± 0.5	2.0 ± 0.2

Légende : nM : Nanomole ; µM : Micromole

Re-viabilisation de la souche 3D7 cryoconservée :

Lors de ces travaux, nous avons revivifié la souche 3D7 conservée à -80°C selon le protocole suivant :

- Décongélation d'un cryotube en bain-marie à 37 °C pendant 2 min.
- Dilution en milieu salin dans 0,1 volume d'une solution de chlorure de sodium (NaCl) 12 % pendant 5 min à 25°C. Puis la solution est reprise dans 10 volumes d'une solution de NaCl 1,6 %.
- Lavage et centrifugation avec du milieu de culture RPMI à 37°C. Répéter 3 fois.
- Le culot érythrocytaire (environ 500 µL) est mis en culture à 37°C en flasque de 20 ml en présence de milieu de culture RPS10 (13,5 ml) et de culot de globules rouges d'un

donneur sain de groupe A+ (1 ml) puis incubé à 37°C sous atmosphère à 5% de CO₂, 10 % d'O₂ et 85% N₂.

Culture classique

La souche 3D7 de *Plasmodium falciparum* est une souche reconnue et bien décrite dans la littérature. Son cycle parasitaire dure 48h en moyenne. Le stade trophozoïte jeune dure 24h, le stade trophozoïte âgé dure 12h et enfin le stade schizonte occupe les 12 dernières heures (Figure 41).

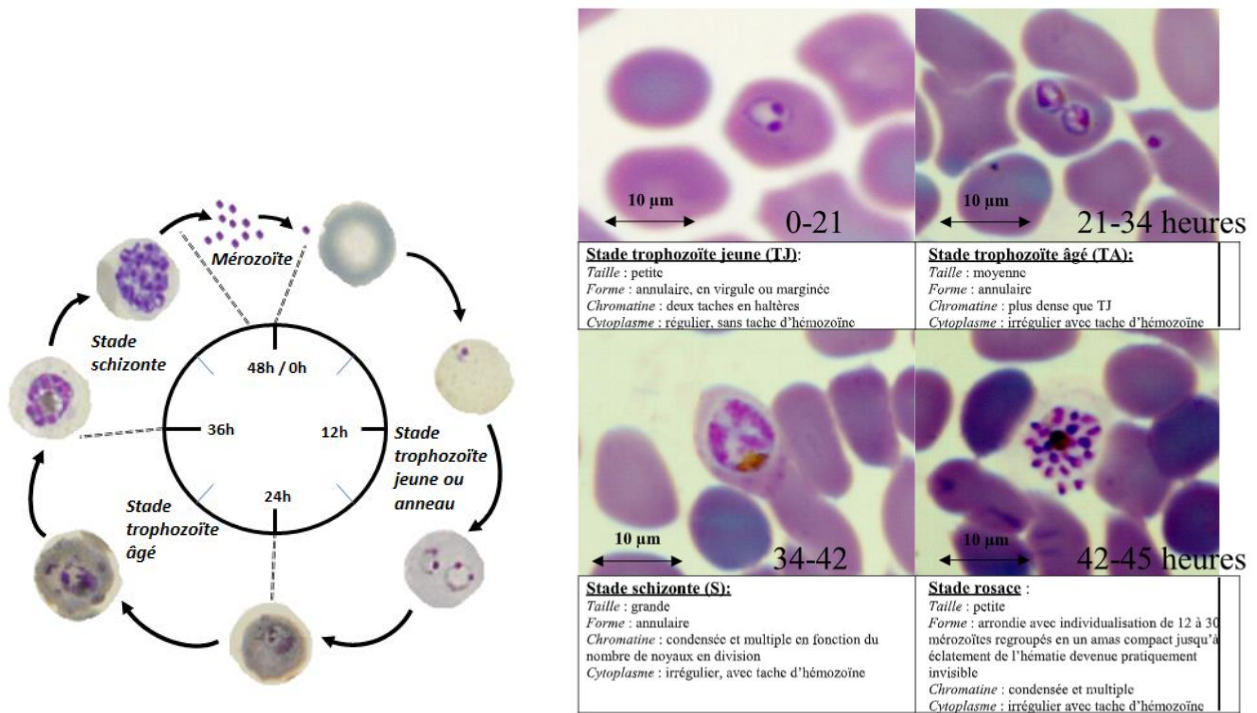


Figure 41 : Représentation du cycle parasitaire in vitro de la souche *Plasmodium falciparum* 3D7 et description des différents stades parasitaires observés

Dans un premier temps, la parasitémie croît doucement dans une phase dite d'adaptation. Puis la parasitémie est maintenue à une parasitémie entre 3 et 6%.

Pour ce faire, dans une flasque de 20 ml, 1.5 ml de culot érythrocytaire de la phase de réveil sont ajoutés à 13.5 ml de milieux de culture RPS10 pour obtenir un hémocrite final de 10%.

- Toutes les 24 h, le milieu de culture est renouvelé par centrifugation du culot et re-suspension dans du milieu de culture RPS10 neuf. Une parasitémie de suivi est effectuée par frottis sanguin coloré au MGG 5%,

- A chaque cycle parasitaire, soit environ tous les 48h, le nombre d'érythrocytes est ajusté afin de pallier la lyse érythrocytaire et le vieillissement prématuré des globules rouges sains et de favoriser les conditions de croissance.
- Si la parasitémie vient à dépasser le seuil de 6%, elle est réajustée à 2-3% par dilution du culot globulaire total comprenant les parasites par ajout de culot globulaire d'érythrocytes sains. Selon les besoins, une partie du culot parasitaire peut être soustrait lors de cette étape et mis à profit pour cultiver de nouvelles flasques et permettre d'augmenter la quantité de matériel parasitaire disponible. Il peut aussi être sauvegardé par cryoconservation pour des manipulations ultérieures.
- Ces étapes sont répétées autant que nécessaire et permettent d'entretenir la culture parasitaire.

Synchronisation :

Cette phase consiste en l'obtention d'un cycle parasitaire synchronisé à un seul stade parasitaire ou au moins majoritaire. On procède à la synchronisation lors de l'obtention d'une parasitémie supérieure à 5% et composée de stade trophozoïtes jeunes majoritaires ($\geq 60\%$ de la parasitémie totale). Lors de la synchronisation, seules les hématies parasitées par les stades parasitaires plus âgés sont lysées, conduisant ainsi à une parasitémie *quasi* exclusivement constituée de stades trophozoïtes jeunes.

Les étapes nécessaires à la synchronisation sont :

- Centrifugation de la culture asynchrone pendant 5 min à 2000 rotations par minute (rpm).
- Prélèvement du culot et re-suspension à raison d'un volume de culot pour 5 volumes de solution de D-sorbitol 5%.
- Incubation pendant 5 minutes à température ambiante.

Au cours de cette phase, seuls les globules rouges non infectés et les globules rouges infectés par les trophozoïtes jeunes survivent.

- Ensuite le D-sorbitol est éliminé du milieu par lavage du culot globulaire, répété deux fois.
- Enfin le culot globulaire débarrassé du D-sorbitol est re-suspendu dans du milieu de culture RPS10.

On obtient une parasitémie diminuée à la fin du procédé et une altération temporaire des trophozoïtes survivants. La culture parasitaire désormais synchrone est remise en culture selon le protocole standard pour obtention d'une parasitémie supérieure à 5%. Bien que synchrone,

les parasites peuvent avoir des variations de cycles expliquées par le fait que les trophozoïtes jeunes survivants sont issus d'une période du cycle qui dure 0 à 24h. Il est possible de réaliser une seconde synchronisation pour réduire la fenêtre des stades parasitaires.

2.1.2 Traitement par doxycycline des cultures de *Plasmodium falciparum*

A) Matériel :

- ❖ Milieu de culture : milieu RPMI-1640 (Gibco, Life Technologies) supplémenté à 10 % en sérum humain (EFS).
 - ❖ Sérum humain : produit dérivé sanguin approvisionné par convention avec l'EFS
 - ❖ Sang humain : sang de groupe A+ approvisionné par convention avec l'EFS
- Parasite : souche 3D7 *Plasmodium falciparum* revitalisé en culture (chapitre 2.1.1). La culture synchronisée est entretenue jusqu'à l'obtention d'une parasitémie supérieure 5% avec majorité de stade trophozoïtes jeunes.

Les travaux ont débuté sur une culture avec une parasitémie à 5.6% dont 83% de forme trophozoïtes jeunes, 13% de forme trophozoïtes âgées, 4% de forme schizontes.

Remarque : les trophozoïtes jeunes observés correspondaient majoritairement aux formes les plus tardives soit de la phase 12-24h du cycle, et étaient donc prêts à évoluer au stade trophozoïtes âgés.

- Centrifugation, récupération du culot érythrocytaire
- Dilution du culot initial à 5.6% de parasitémie au 9/10ème par ajout de culot érythrocytaire de sang A+ pour ajuster la parasitémie finale à 5%.
- Dilution du culot érythrocytaire dans du milieu RPS10 pour obtention un hémocrite à 10%
- ❖ Préparation de la solution de doxycycline à 14.5 µM qui sera utilisée à la concentration finale correspondant à la CI50 de la souche 3D7 c'est à dire 11.6 µM.
- Doxycycline hyclate Sigma Aldrich® D9891 ; poudre, pureté 93,5% ; numéro CAS : 24390-14-5 ; MDL : MFCD07357237 ; ID de substance PubChem 57654124
- ❖ Fixation chimique par solution fixatrice de glutaraldéhyde 2 %

B) Protocole de mise en culture :

➤ 3 plaques de culture de 24 puits sont préparées selon le protocole suivant :

- Témoin négatif (T-) : temps 0h, 12h, 24h, 36h, 48h 500 µL de suspension de la souche 3D7 (hémocrite 10%, parasitémie 5%) + 2 ml de milieu RPS 10.

- ❖ Echantillons traités par doxycycline (Dox), déposés en duplicate et nommés Dox 1 et Dox 2 : temps 0h, 12h, 24h, 36h, 48h
- ❖ 500 µL suspension de la souche 3D7, (hématocrite 10%) + 2 ml d'une solution de doxycycline à 14.5 µM pour une concentration finale à 11.6 µM Plans des plaques 24 puits : Les plaques sont incubées à 37°C sous 5% CO₂, 10% O₂, 85%

Plaque 1 : temps 0h

H2O	H2O	H2O	H2O	H2O	H2O
H2O	T- t=0h	Dox 1 t=0h	Dox 2 t=0h	H2O	H2O
H2O	H2O	H2O	H2O	H2O	H2O
H2O	H2O	H2O	H2O	H2O	H2O

Plaque 2 : temps 12h et 24 h

H2O	H2O	H2O	H2O	H2O	H2O
H2O	T- t=12h	Dox 1 t=12h	Dox 2 t=12h	H2O	H2O
H2O	T- t=24h	Dox 1 t=24h	Dox 2 t=24h	H2O	H2O
H2O	H2O	H2O	H2O	H2O	H2O

Plaque 3 : temps 36h et 48 h

H2O	H2O	H2O	H2O	H2O	H2O
H2O	T- t=36h	Dox 1 t=36h	Dox 2 t=36h	H2O	H2O
H2O	T- t=48h	Dox 1 t=48h	Dox 2 t=h48	H2O	H2O
H2O	H2O	H2O	H2O	H2O	H2O

Figure 42 : Schéma des plans de plaque de culture *in vitro* de *Plasmodium falciparum* soumis à chimiothérapie par doxycycline 11.6 µM

➤ Constitution des échantillons pour la MET :

- ❖ Les échantillons sont prélevés aux temps correspondants :
 - Au temps t = 0h :
 - du témoin (-) correspondant
 - de Dox 1 t=0h et Dox 2 t=0h
 - Au temps 12h :

- du témoin (-) correspondant
- de Dox 1 t=12h et Dox 2 t=12h
- Au temps 24h
 - du témoin (-) correspondant
 - de Dox 1 et Dox 2 t=24h
- Au temps 36h
 - du témoin (-) correspondant et de Dox et Dox 2 t=36h
- Au temps 48h
 - du témoin (-) correspondant
 - de Dox 1 t=48h et Dox 2 t=48h

Lors du prélèvement de chaque échantillon, une parasitémie est effectuée par frottis sanguin coloré au Giemsa 5%.

- ❖ Les culots érythrocytaires de chaque puits sont récupérés et centrifugés à 2000 rpm pendant 5 min.
- ❖ Puis ils sont fixés par ajout de 1 ml d'une solution de glutaraldéhyde 2% et conservés à 4°C

2.1.3 Microscopie électronique à transmission de *Plasmodium falciparum* soumis à la doxycycline

La MET nécessite une préparation des échantillons avant observation. Les échantillons précédemment obtenus sont solidifiés, découpés en fine lamelles puis mis sur grilles spécifiques.

2.1.3.1 Inclusion et solidification des échantillons

A) Matériel :

Tous les réactifs/liquides/solutions dans cette étape sont filtrés à 0.2 µm avant usage et les mélanges sont réalisés sous hotte chimique. Toutes les centrifugations sont effectuées à 5000 tours/min.

- ❖ Tampon cacodylate 0.4M 100 ml :
 - Solution cacodylate de sodium 0,8M : pesée 17,12 g cacodylate de Na (masse molaire (MM) = 214 g/mol) dans 100 ml d'H₂O ultrapure

⇒ le pH est ajusté avec de l'acide chlorhydrique (HCL) 0.8N pour se situer dans l'intervalle de pH [6.8-7.4].

- Constitution du tampon cacodylate selon ph obtenu :

Tableau 6 : Tableau de correction d'acidité du tampon cacodylate 0,4N à conserver à 4 °C

	pH			
	6,8	7	7,2	7,4
Cacodylate de sodium 0,8 M	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml
HCl 0,8N	9,3 mL	6,3 mL	4,2 mL	2,7 mL
Eau distillée	QSP 100 mL.....			

Légende : QSP : quantité suffisante pour HCL : acide chlorhydrique ; N : moles par litres ; M : millimolaire (millimoles/litre)

- ❖ Solution glutaraldéhyde 2% d'osmolarité 400 milliosmoles (mOsm) 20mL :
 - Solution 1 de glutaraldéhyde à 25%, 4 mL + 21 mL H₂O ultrapure => Solution 2 glutaraldéhyde 4%.
 - Solution 2 glutaraldéhyde 4% 10 mL (200 mOsm) + Tampon cacodylate 0,4 M, 5mL (200 mOsm) + H₂O ultrapure 5 mL.

⇒ 20 mL solution de glutaraldéhyde 2% tamponné (400 mOsm). L'osmolarité du glutaraldéhyde doit être proche de l'osmolarité physiologique pour globule rouges.
- ❖ Solution saccharose 0.4M, 25 mL :
 - Pesée 34.23 g de saccharose (MM : 342,3 g/moles), dissolution dans 25 mL d'H₂O ultrapure.
- ❖ Milieu de lavage post fixation : d'osmolarité = 400 mOsm, 50 mL
 - Tampon cacodylate 0.4M, 12.5mL (200 mOsm) + solution saccharose 25 mL (200 mOsm) + 12.5mL d'H₂O ultrapure.
- ❖ Solution ferrocyanure de potassium 0,2M ; 10mL
 - Pesée 0.66 g de ferricyanure de K (MM : 324,29 g/moles,) et dissolution dans 10 mL d'H₂O ultra stérile
- ❖ Solution de post fixation
 - 10 mL de solution de ferricyanure de K + 10 mL de solution d'Osmium OsO₄ 2%
- ❖ Solutions éthanol :

- Solution 100% : Utiliser éthanol absolu pure de titre 100% 200 mL
- Solution 96% : tableau 7
- Solution 70% : tableau 7
- Solution 50% : tableau 7
- Solution 30% : tableau 7

Tableau 7 : Tableau d'obtention des différents titres d'alcool

	Titre d'alcool à obtenir			
	30%	50%	70%	96%
Ethanol absolu	25 mL	50 mL	100 mL	100 mL
H2O distillée	60,6 mL	53,7 mL	4,7 mL	6,5 mL
Volume finale	85,6 mL	103,7 mL	104,7 mL	106,5 mL

❖ Résine époxy – EPON™ (812):

- Epon solution A : mélange solution Epon 11,5 mL + solution dodécyl ducconic anhydride (DDSA) 18.5 mL, volume final = 30 mL. Agitation continue 1h avant usage
- Epon solution B : mélange solution Epon (812) 37 mL + solution méthyl nadic anhydride (MNA) 33mL, volume final =70 mL
- Solution finale Epon (A+B) 100%, 100 mL :
 - Faire sécher un pilulier à l'étuve en ambiance sèche à 55°C 30 min, puis le sortir 15 min avant l'expérience.
 - Dans le pilulier : mélanger la solution A 30 mL et la solution B 70 mL
 - Ajouter après 2 min d'agitation magnétique 170 µL de DMP30 (2,4,6-Tri-diméthylamino méthyl phenol)
 - Laisser agiter 1h avant usage
- Constitution des sous mélange d'Epon 75%, 50%, 25%
 - Epon 25 % : Ethanol 100% 15 mL+ Epon 100% 5 mL
 - Epon 50 % : Ethanol 100% 10 mL+ Epon 100% 10 mL
 - Epon 75 % : Ethanol 100% 5mL + Epon 100% 15 mL

B) Protocole :

❖ Fixation :

La fixation est réalisée immédiatement après prélèvement de l'échantillon à chaque temps dédié. Le culot cellulaire contenant les GR parasités (environ 500 µL) est remis en suspension dans 1 mL de glutaraldéhyde 2% et est conservé à 4°C à l'abri de la lumière.

❖ Lavage :

- Centrifugation
- Elimination de la phase non érythrocytaire
- 3 phases successives de lavage à l'aide du milieu de lavage post fixation 10 min / centrifugation 10 min

❖ Post Fixation :

Reprendre le culot après centrifugation et le mettre en suspension dans 1 mL de solution post fixation à l'abri de la lumière pendant 1h.

❖ Lavage à l'H₂O ultrapure :

Après centrifugation, faire 3 étapes successives de reprise de culot dans un bain d'H₂O ultra pure 1 mL pendant 10 min/centrifugation.

❖ Déshydratation :

Après centrifugation, faire 3 étapes successives de reprise de culot dans une solution 1 mL de titre croissant en éthanol, 30% 10 min, 50% 3 min, 70% 3 min, 96% 10 min, 100% 10min puis 100% 30 min.

❖ Substitution :

Après centrifugation, faire 3 étapes successives de reprise de culot dans solution une solution éthanol/EPON 1 mL de titre croissant en EPON (25% > 50% > 75%) 15 min et centrifugation 10 min.

❖ Imprégnation : *les tubes doivent restés ouverts durant cette étape pour permettre l'évaporation des solvants.*

Reprendre le culot après centrifugation 10 min et le mettre en suspension dans 1 mL d'EPON 100% 1h.

Reprendre le culot après centrifugation 10 min et le mettre en suspension dans 1 mL d'EPON 100% 1h.

❖ Polymérisation : *les tubes doivent rester ouverts durant cette étape pour permettre l'évaporation des solvants.*

Reprendre le culot après centrifugation 10 min et le mettre en suspension dans 350 μ l d'EPON 100% 1h.

Mettre à chauffer à 60°C à l'étuve en condition sèche, 24h.

2.1.3.2 Coupe et observation au microscopie électronique à transmission

A) Matériel :

- ❖ Ultramicrotome UC7 Leica®
- ❖ Couteaux diamant :
 - TYPE CD Cryo ultramicrotomie sèche (cryo Ultramicrotomy dry) 50nm–1 μ m -200°C,
 - TYPE CW Cryo ultramicrotomie humide (cryo Ultramicrotomy wet) 50nm-1 μ m-200°C
- ❖ Grilles HR25 300 Mesh Copper/Rhodium (TAAB, Royaume-Uni)
- ❖ Produits contrastants de coupe :
 - Solution méthanol : titre 50%, 25%
 - Solution acétate urany 5%l :
Dissoudre 0.5 g d'acétate d'uranyl dans 10 mL de solution méthanol 50%.
 - Solution citrate de plomb :
Préparer 3 mL solution A de citrate de sodium 1M et 2 mL de solution B nitrate de plomb 1M.
Préparer 10 mL de solution de soude C 1M (0.4g de NaOH pastille dans 10 mL eau).
Mélanger les solutions A et B avec 16 mL H₂O ultrapure.
Ajouter 4mL de solution C au mélange A+B, conservation à 4°C.
- ❖ Microscopie électronique à transmission :
 - MET Tecnai G20 F20 Thermo-Fischer/FEI® fonctionnant à la tension de 200 keV et équipé d'une caméra Eagle de 4096 \times 4096 pixels de résolution (FEI). L'ensemble des images a été réalisé sur le site de l'IHU Marseille et sur la plateforme PICsL de Luminy Marseille (Nicolas Brouilly).

B) Protocole :

- ❖ Réalisation des coupes :
 - Démouler les culots durcis en résines
 - Dégrossir à l'aide de la pointe diamant sur ultramicrotome Leica UC7
 - Réaliser des coupes de 70 nm par pointe diamant

- Récupérer les coupes et les déposer chacune sur une grille HR25 300 Mesh Copper/Rhodium

❖ Contraste des coupes :

- Acétate d'uranyle 5% :

Déposer sur les grilles avec les coupes, 25 μ L d'acétate d'uranyl, et laisser reposer pendant 15 min dans l'obscurité totale.

Rincer 20 fois les grilles successivement dans les solutions suivantes :

1 – méthanol 50%

2 – méthanol 50%

3 - méthanol 25%

4 - H₂O distillée filtrée

Faire sécher les grilles

- Citrate de plomb :

Déposer sur les grilles 25 μ L de solution de citrate de plomb, et laisser au contact 1 min dans une boîte de pétri hermétique.

Rincer 20 fois successivement dans 3 solutions d' H₂O pure.

Faire sécher les grilles à l'air libre.

❖ Observation en MET :

- Observation des coupes des échantillons sur MET Tecnai G2 (Thermo-Fischer/FEI) soumis à tension 200 keV.
- Réalisation de 90 images sur les parasites traités et 49 sur les non traités à t=0h, temps=12h nous avons réalisé 115 clichés sur les parasites traités, et au temps=48h, 63 clichés sur des parasites traités, et 92 sur des parasites non traités. Les images numériques ont été produites sur caméra CCD à une échelle de grossissement de 0.500 μ m et 1 μ m pour les échantillons correspondants aux temps 0h, 12h et 48h.

RESULTATS

2.2 Résultats

2.2.1 Effets sur la parasitémie

Au cours de ces travaux, la parasitémie a été suivie par microscopie optique et les parasites ont été classés selon leurs stades de développement en 3 groupes : trophozoïtes jeunes, trophozoïtes âgés et schizontes. Le développement du parasite a été évalué par microscopie optique et les données sont présentées dans le tableau 8.

Tableau 8 : Description des parasitémies de *Plasmodium falciparum* traités et non traités par doxycycline 11.6µM

Temps culture (heure)	Groupe traité	Parasitémie totale / GR sains (%)	Parasitémie par stade parasitaire		
			Trophozoïtes jeunes (TJ)	Trophozoïtes âgés (TA)	Schizontes (S)
t-1, parasitémie avant dilution		5,6%	83%	13%	4%
t=0h	Dox 1	5,1%	81%	12%	7%
	Dox 2	5,1%	81%	12%	7%
	témoin (-)	5%	83%	12,5%	4,5%
t=12h	Dox 1	5%	38%	54%	8%
	Dox 2	4,8%	40%	52%	8%
	témoin (-)	5,2%	43%	47%	10%
t=24h	Dox 1	5%	15%	22%	63%
	Dox 2	5%	23%	15%	62%
	témoin (-)	5,2%	23%	15%	61%
t=36h	Dox 1	5,1%	17%	17%	67%
	Dox 2	5,2%	18%	13%	69%
	témoin (-)	6,9%	54%	15%	31%
t=48h	Dox 1	3,7%	22%	0%	78%
	Dox 2	4%	20%	0%	80%
	témoin (-)	7,6%	61%	15%	24%

❖ Groupe Témoin (-) :

- Dans le groupe témoin à t=0h, la parasitémie était de 5%, et était représentée à 83% par des trophozoïtes jeunes, 12,5% de trophozoïtes âgés et 4,5% de schizontes.
- Après 12h, la parasitémie est resté à 5,2%. On observe la maturation des formes parasitaires, avec une baisse des formes trophozoïtes jeunes qui ne représentent plus que 43% de la parasitémie à ce temps. Dans le même temps, les trophozoïtes âgés sont devenus la forme majoritaire avec 47% de la parasitémie totale. Les schizontes représentent 10% de la parasitémie à ce stade.

- A 24h, la parasitémie totale n'a pas évolué et représente toujours 5,2% des hématies totales. On observe une baisse des formes trophozoïtes jeunes et âgés qui ne représentent plus que 23% et 15% respectivement. A ce temps, les schizontes sont majoritaires, représentant 61% de la parasitémie totale.
- A 36h, la parasitémie augmente à 6,9%. L'augmentation de la parasitémie traduit de l'éclatement des formes schizontes conduisant à leur baisse dans le compte de la parasitémie totale. A ce temps ils ne représentent plus que 31% des formes parasitaires. Elle est aussi le reflet de la multiplication des trophozoïtes jeunes ayant réussi à infecter un nouvel érythrocyte. Au temps $t=36h$, ils représentent 54% de la parasitémie et ils sont la cause de l'augmentation de la parasitémie.
- A 48h, la parasitémie a continué à croître jusqu'à 7,6%. Quelques schizontes légèrement asynchrones ont fini leur évolution et ont libéré de nouveaux trophozoïtes. On retrouve toujours des schizontes à 24% de la parasitémie totale dans notre culture. Le pourcentage de trophozoïtes jeunes a continué à progresser, et ils représentent désormais 61% de la parasitémie totale. Le nombre de trophozoïtes âgés ne semble pas subir de variation importante et leur nombre stagne à 15% de la parasitémie totale.

❖ **Echantillons traités par la doxycycline (Dox 1, Dox2):**

- Au temps $t=0h$, les duplicatas Dox 1 et Dox 2 affichent une parasitémie initiale de 5,1% proche du groupe contrôle, témoignant d'une bonne répartition des culots parasitaires. Les différents stades parasitaires pour Dox1 et Dox 2 sont à des seuils proches. Les formes trophozoïtes jeunes représentent 81% de la parasitémie, les trophozoïtes âgés 12%, et les schizontes 7%.
- A 12h, la parasitémie reste stable de l'ordre de 5% pour Dox 1 et de 4,8% pour Dox2. L'évolution des stades parasitaires semble progresser à la même allure que pour le groupe témoin. On retrouve ainsi pour Dox 1 et Dox 2 respectivement 38% et 40% de formes trophozoïtes jeunes, 54% et 52% de formes trophozoïtes âgés, 8% et 8% de schizontes.
- A 24h, la parasitémie n'a pas progressé et est de 5% pour Dox 1 et Dox 2 et est similaire au contrôle, de même que la progression des stades parasitaires du parasite. Ainsi on retrouve pour Dox 1 et Dox 2 respectivement 15% et 23% de formes trophozoïtes jeunes, 22% et 15% de formes trophozoïtes âgés, et 63% et 62% de formes schizontes.

- Dès 36h, on observe un ralentissement de maturation des parasites traités par rapport au contrôle. Elle se traduit chez Dox 1 et Dox 2 par une stagnation dans le cycle parasitaire à la forme schizonte, qui représente respectivement 67% et 69% de la parasitémie contre 31% pour le contrôle. En parallèle à cette stagnation, on retrouve une parasitémie de 5,1% et 5,2% pour Dox 1 et Dox 2 respectivement, proche de celle retrouvée au temps t=24h. Contrairement au groupe témoin, il ne semble pas y avoir eu d'éclatement massif des schizontes qui aurait conduit à l'augmentation de la parasitémie. Le pourcentage de formes trophozoïtes jeunes n'a pas progressé et ils représentent 17% de la parasitémie pour Dox 1 et 18% pour Dox 2, tandis que le contrôle affiche désormais 54% de trophozoïtes jeunes à ce temps. Les formes trophozoïtes âgées représentent elles, 17% et 13% de la parasitémie totale pour Dox 1 et Dox 2 respectivement.
- A 48h, on observe toujours un blocage quantitatif de maturation des schizontes chez les parasites traités, avec un retard de 24h par rapport au contrôle. En conséquence, on voit une accumulation des formes schizontes qui s'élèvent à 78% et 80% des formes parasitaires pour Dox 1 et Dox 2 respectivement.

Il semblerait que, malgré tout, une petite fraction de schizontes parvient à éclater, puisque le pourcentage de formes jeunes pour Dox 1 et Dox 2 a légèrement progressé depuis t=36h, avec 22% et 20% de trophozoïtes jeunes pour Dox 1 et Dox2 à t=48h versus 17% et 18% pour Dox 1 et Dox 2 respectivement à t=36h.

Malgré la stagnation du pourcentage de schizontes et la légère progression des formes trophozoïtes jeunes, la parasitémie de 3,7% pour Dox 1 et 4% pour Dox 2 est en diminution à t=48h par rapport à t=36h parasitémie=5,1% pour les parasites traités, mais aussi par rapport au contrôle à 7,6%. A la vue de nos données, cette diminution semble être due à la variation du pourcentage de formes trophozoïtes âgés. En effet, on observe une absence de formes trophozoïtes âgés qui sont à 0% pour Dox 1 et Dox 2.

Bien qu'il soit difficile d'objectiver des modifications morphologiques fines en microscopie optique, les schizontes traités à l'observation directe par coloration MGG des temps t=36h et t=48h semblaient plus dysmorphiques par rapport aux parasites non traités (Figure 43).

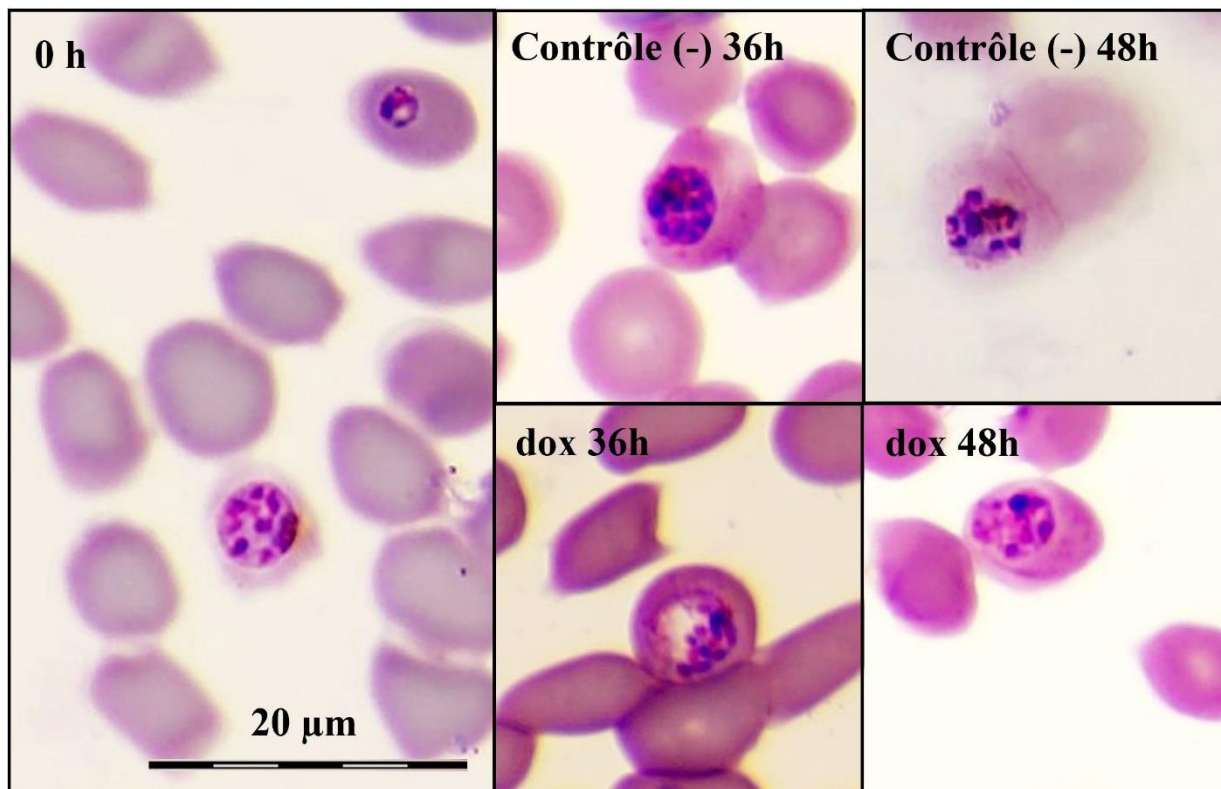


Figure 43 : Schizontes de *Plasmodium falciparum* colorés par MGG et observés en microscopie optique.

A noter que les duplicatas Dox 1 et Dox 2 ont présenté aux différents temps des parasitémies équivalentes et une distribution similaire des stades parasitaires, témoignant d'une bonne reproductibilité de ces expériences.

2.2.2 Modifications morphologiques de la chimiothérapie sur l'ultrastructure parasitaire en microscopie électronique à transmission

Afin d'identifier les changements ultra structuraux associés au traitement par la doxycycline, une série d'observations en MET a été réalisée aux temps $t=0h$, $t=12h$ et $t=48h$ sur les parasites traités et non traités.

❖ Description morphologique ultra structurale de *Plasmodium falciparum* in vitro :

Dans un premier temps, nous allons décrire les observations de l'évolution des stades parasitaires en MET chez les parasites non traités du groupe contrôle. Ces premières observations nous ont permis d'identifier les différents stades parasitaires et organelles du parasite pour pouvoir par la suite, mieux appréhender les modifications observées chez les parasites traités. Au cours de nos travaux, nous avons ainsi pu visualiser les différents stades du parasite.

Comme décrit d'après Bannister et al., le trophozoïte jeune possède une forme annulaire, avec un espace vide en son centre (91). La coupe passant par le noyau permet de visualiser ce dernier en 2 points sur l'image. On observe également quelques vésicules endocytiques (Figure 44).

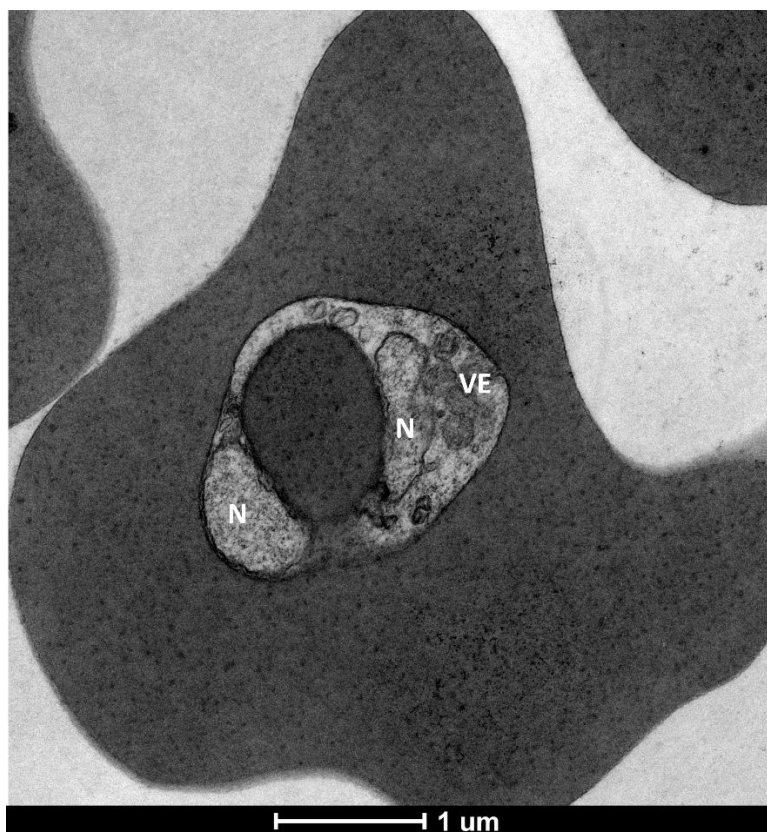


Figure 44 : Image en MET d'un trophozoïte jeune de *Plasmodium falciparum* issue du témoin (-) à t=48h

Légende : N : noyau ; VE : vésicules endocytiques

Au fur et à mesure que le parasite a progressé dans son cycle pour arriver au stade trophozoïte mature, la forme du parasite prend une forme sphérique associée à un accroissement de sa taille. Les vésicules endocytiques avaient tendance à se grouper, et une partie des trophozoïtes âgés possédaient une vacuole digestive principale. La vacuole digestive unique apparaissait vers le stade trophozoïte âgé et augmentait de taille au cours de la progression vers le stade schizonte. Que ce soit dans les vésicules endocytiques ou dans la vacuole digestive, les premiers cristaux d'hémozoïnes sont visualisables. Il a été parfois possible de repérer l'apicoplaste grâce à la spécificité de sa structure membraneuse composée de triple/quadruple membranes (Figure 45).

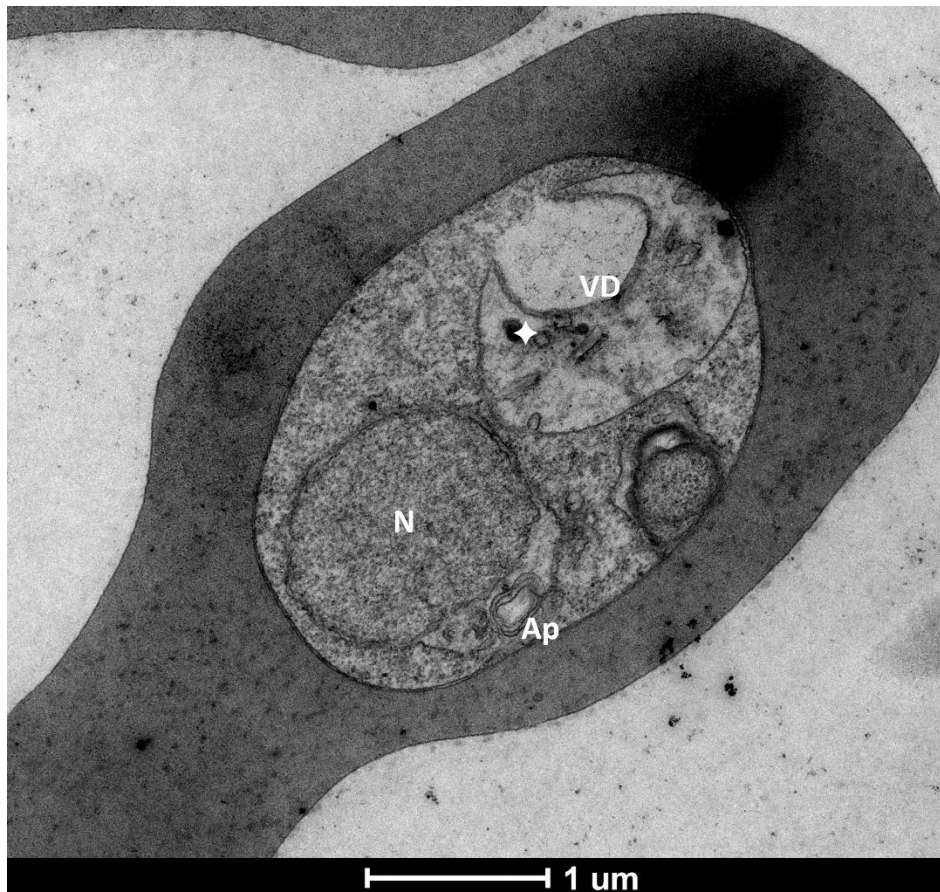


Figure 45 : Image en MET d'un trophozoïte âgé de *Plasmodium falciparum* issue du témoin (-) à t=48h

Légende : N : noyau ; VD : vésicule digestive principale ; ◆ cristal hémotoïne ; Ap : apicoplaste

Lors du processus de maturation finale des trophozoïtes qui conduit aux schizontes, nous avons pu visualiser la maturation du stade schizonte passant par plusieurs sous étapes. Lors du passage du trophozoïte âgé vers le schizonte jeune, nous avons pu visualiser la multiplication des noyaux (Figure 46 A). Les noyaux commencent alors à s'organiser autour de la vacuole digestive principale (Figure 46 A). On observe aussi une multiplication des mitochondries, qui correspond au développement du réseau mitochondriale et apicoplastique (Figure 46 A).

Puis lors de la maturation du schizonte, nous visualisons le début de formation des premiers mérozoïtes par la visualisation des structures apparentes aux rhoptries et par le développement d'invaginations (Iv) de membrane autour du mérozoïte composé d'un noyau, d'une mitochondrie et d'une rhoptrie en cours de maturation. Les premiers mérozoïtes matures restent ensuite latents, le temps que les derniers mérozoïtes arrivent à maturation (Figure 46 B). Enfin, nous avons visualisé un schizonte éclaté, dont la vésicule parasitophore s'est rompue. Au sein des restes de cette dernière, on peut voir plusieurs mérozoïtes complets encore liés à la vésicule digestive (Figure 46 C).

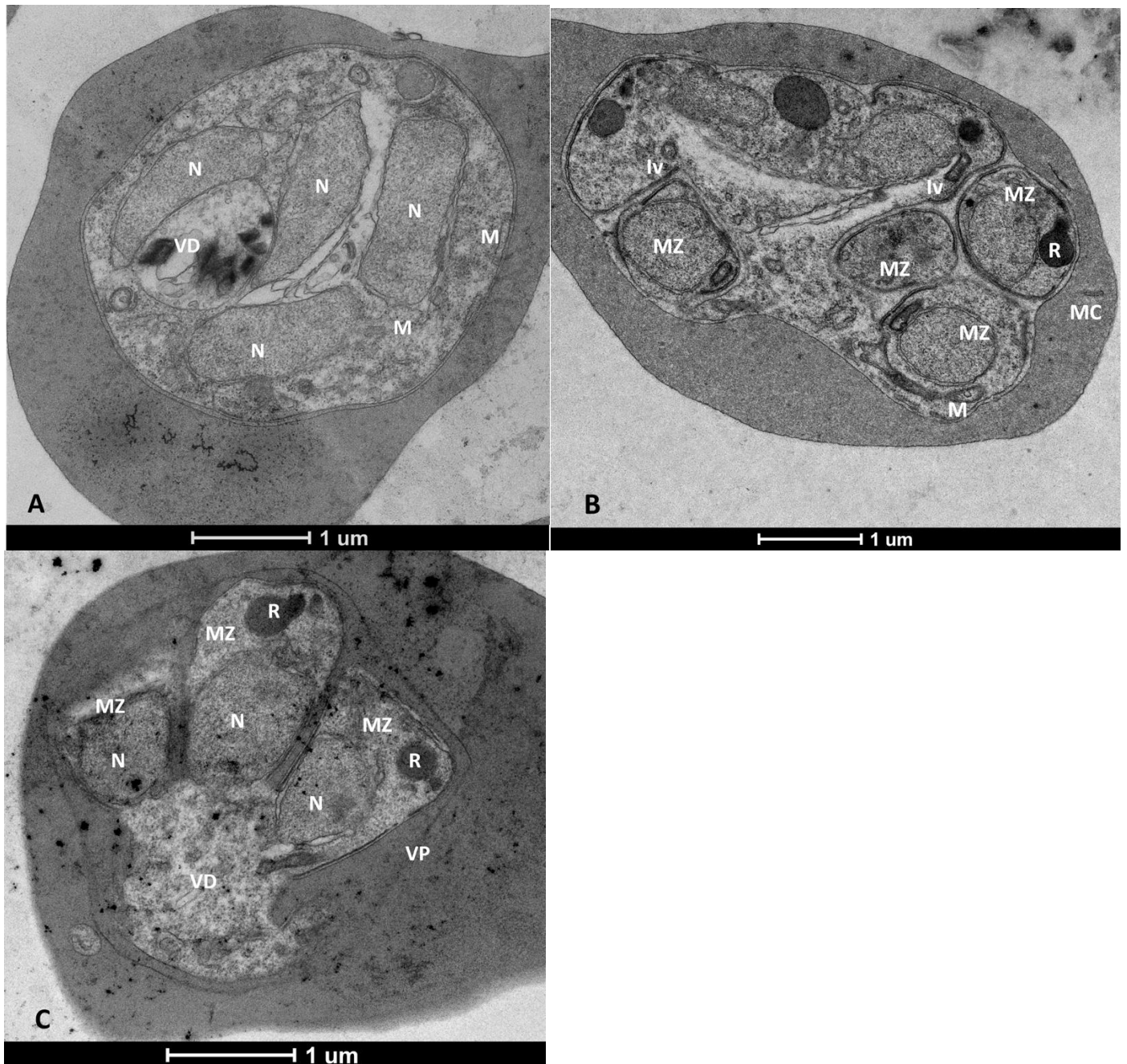


Figure 46 : Images A, B, C en MET de schizontes de *Plasmodium falciparum* issues du témoin (-) à t=48h

Légende : A : Schizonte jeune avec visualisation des noyaux et de mitochondries, B : Schizonte avec mérozoïtes en formation et visualisation des rhoptries, C : Schizonte mature en cours d'éclatement

N : noyau ; M : mitochondrie ; R : rhoptrie ; VD : vésicule digestive principale ; Iv : invagination ; MC : tache de Maurer ; VP : vacuole parasitophore

Au cours de la réalisation des clichés du témoin (-), plusieurs organelles ont pu aussi être identifiés sur plusieurs coupes à différents stades, dont les mitochondries (avec leurs crêtes spécifiques), l'apicoplaste (caractérisé par ses triples membranes en MET), l'acidocalcisome, les taches de Maurer, les corps de Golgi, le noyau, les cytotomes, les cristaux d'hémozoïne (Figure 45) (Figure 46) (Figure 47).

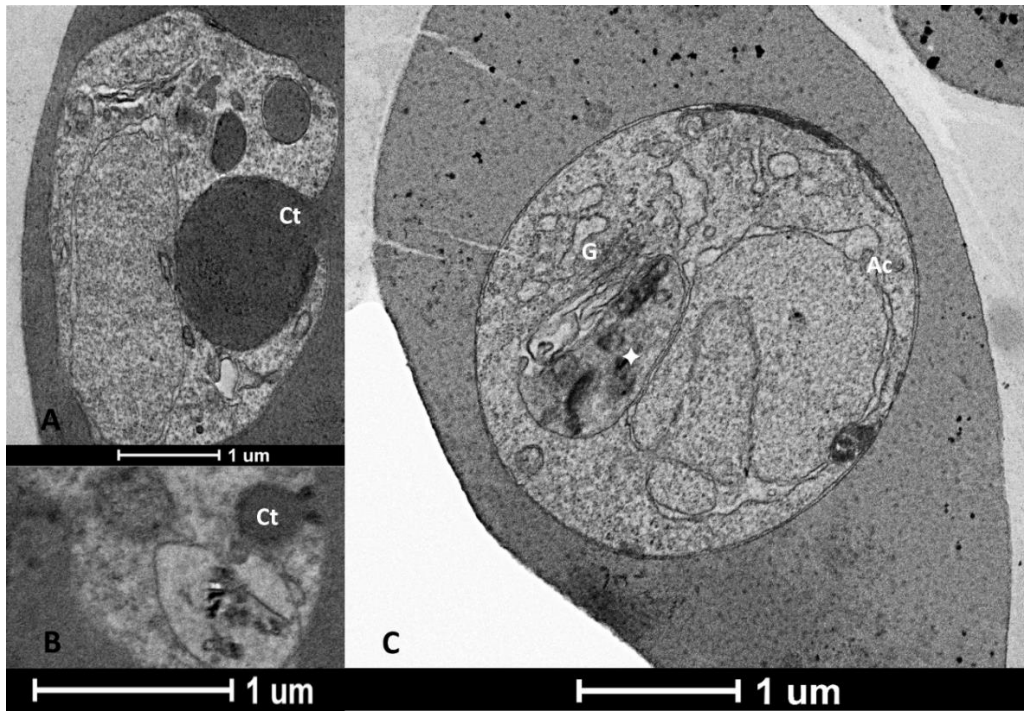


Figure 47 : Images A, B, C en MET de de *Plasmodium falciparum* issues du témoin (-) à t=48h

Légende : A : Trophozoïte âgé et cytostome actif ; B : Trophozoïte jeune et cytostome actif ; C : Schizonte jeune avec présence d'acidocalcisome et réseau vésiculaire correspondant à un appareil de Golgi
 Ct : Cytostome, G : Réseau vésiculaire correspondant à un appareil de Golgi ; Ac : Acidocalcisome

Dans un second temps, nous allons décrire les observations de l'évolution des stades parasites en MET chez les parasites traités par la doxycycline. Dans les érythrocytes infectés et traités par doxycycline, un certain nombre de changements morphologiques ont été notés par rapport au groupe contrôle.

Néanmoins au temps t=0h et t=12h, nous n'avons pas observé de changements significatifs entre le groupe contrôle et les parasites traités.

Ce n'est qu'à partir du temps t=48h, que des changements morphologiques ont été observés et essentiellement au niveau des schizontes. Pour rappel, à 48h, la culture *in vitro* de *P. falciparum* traité par doxycycline montrait une large supériorité en nombre de schizontes.

- Au temps t=48h, certains schizontes observés ont développé une partie des structures propres à ce stade telles que les rhoptries (Figure 48 A). En revanche la majorité des schizontes traités semblent montrer un retard de maturation important de plus de 12h objectivé par un retard de maturation des rhoptries (Figure 48 B), et jusqu'à une absence de formation de rhoptries

matures (Figure 48 C). Il était aussi possible d'observer une absence de segmentation mérozoïtaire qui aurait dû faire son apparition depuis plus de 12h (Figure 48C).

- Au temps $t=48h$, nous avons observé que certains schizontes traités possèdent plusieurs petites vésicules endocytiques ou vacuoles digestives au lieu d'une unique VD chez les parasites non traités (Figure 48).

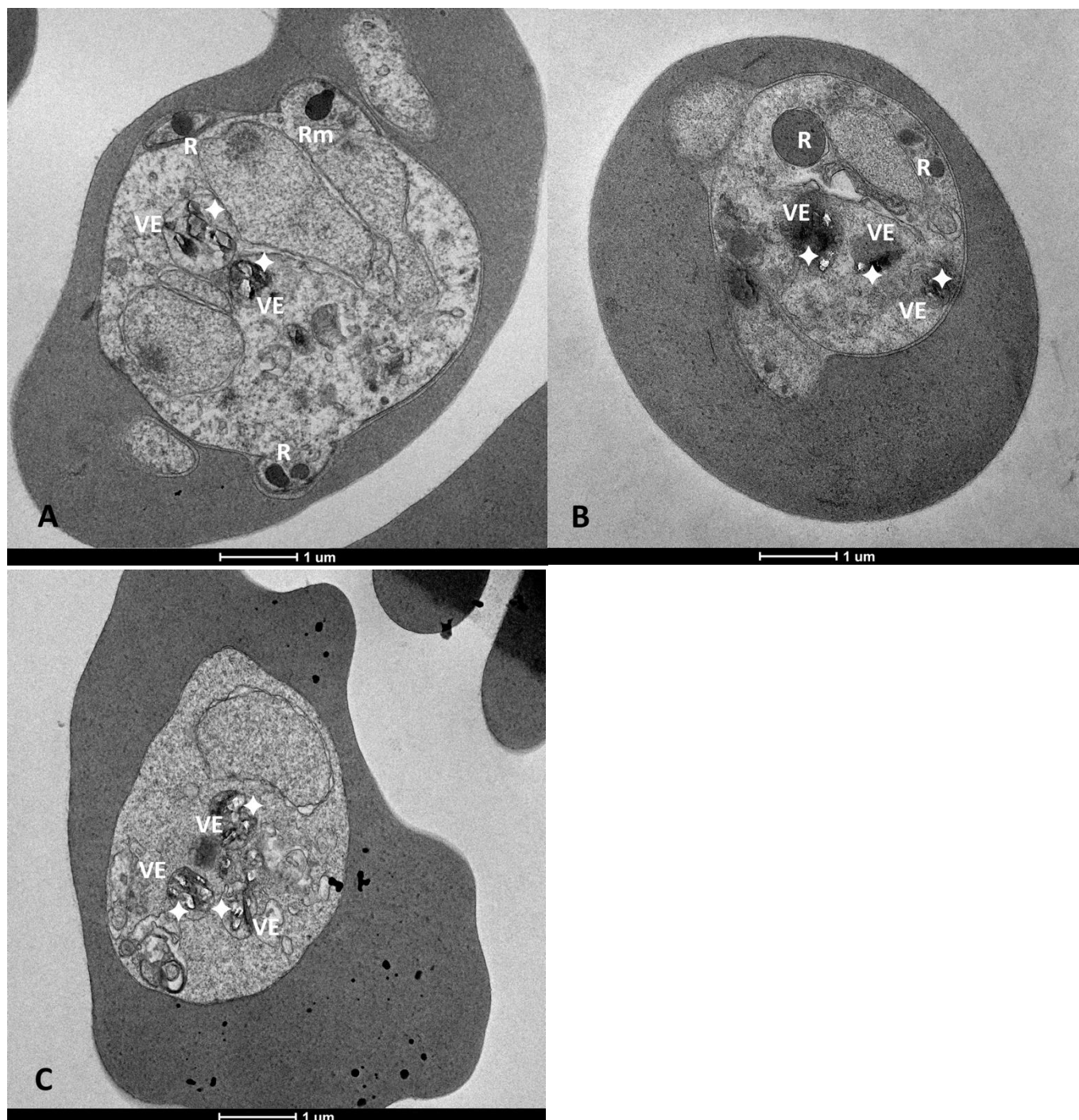


Figure 48 : Images A, B, C en MET de schizontes de *Plasmodium falciparum* à $t=48h$ traités par doxycycline $11.6 \mu M$ avec plusieurs vacuoles digestives

Légende : A : Schizonte avec rhoptrie mature et en cours de différenciation ; B : Schizonte avec retard de maturation des rhoptries et des invaginations mérozoïtaire ; C : Schizonte avec absence de rhoptries et retard de segmentation

◆ : cristal hémozoïne ; VE : vésicule endocytique ; Rm : rhoptrie mature ; R : rhoptrie

- Nous avons observé que ces multiples vésicules/vacuoles digestives contenaient de nombreux cristaux d'hémozoïnes. La présence de ces cristaux indique que ces vésicules/vacuoles digestives restent actives dans le processus de digestion de l'hémoglobine malgré l'absence de maturation définitive en une unique VD. Nous pouvons émettre deux hypothèses. Les nombreuses vésicules endocytiques, semblent ne pas avoir fusionnées en une unique vésicule digestive comme elles auraient dû au cours de la progression du cycle du parasite normal, notamment lors de son arrivé au stade schizonte (Figure 48 A, B, C). La seconde hypothèse sur leur origine serait que la VD principale se serait fragmentée en multiples petites VD après sa formation.
- De plus, nous avons observé à 48h que les érythrocytes infectés et traités possédaient dans leurs cytoplasmes un nombre plus important de structures membraneuses que les érythrocytes parasités non traités au même temps. Bien que de telles structures aient été parfois visualisées dans le groupe contrôle, nous observons un plus grand nombre de ses structures membraneuses, ainsi qu'une taille plus importante par rapport au contrôle. Cette structure semble être composée d'une membrane monocouche, et qui a tendance à se sphériser. Lors de nos observations elles possédaient des tailles assez hétérogènes allant de 0,1 μm à 1 μm de diamètre (Figure 49 A, B, C) (Figure 50).

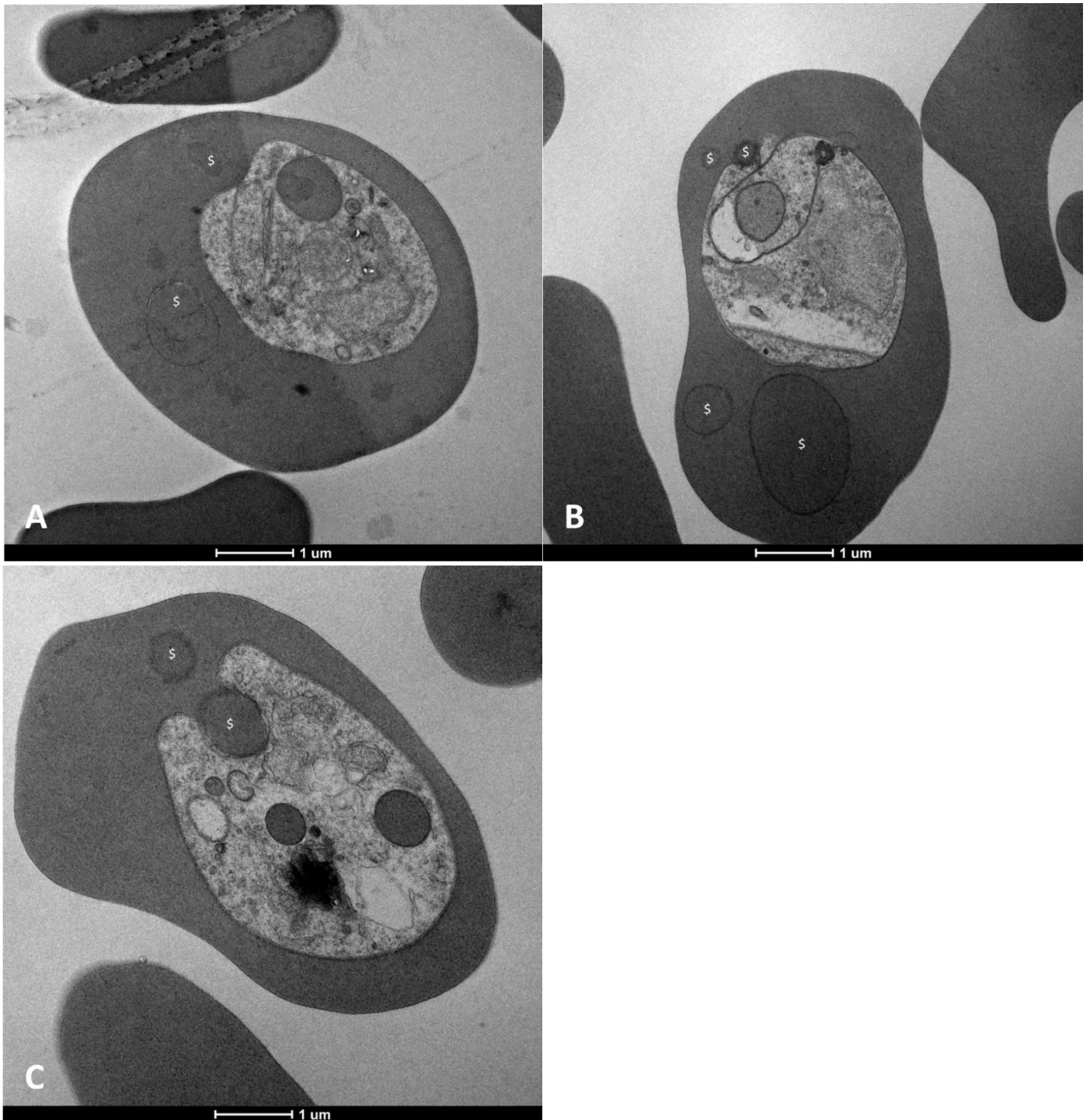


Figure 49 : Images en MET de schizontes de *Plasmodium falciparum* à t=48h traités par doxycycline 11.6μM : mise en évidence des structures membraneuses monocouches dans le cytoplasme de l'érythrocyte infecté

Légende : S : structures membraneuses

Parfois dans le cytoplasme des érythrocytes traités, nous avons observé des sous-ensembles de structure membranaire sphérisés au sein même de ces structures membranaires monocouches. En l'état actuel de l'avancée de ce travail, l'origine de ces structures demeure incertaine (Figure 50).



Figure 50 : Image en MET de schizonte de *Plasmodium falciparum* à t=48h traité par doxycycline 11.6 μ M avec nombreuses structures membraneuses

Légende : \$: structure membraneuse

- Nous n'avons pas observé les protéines membranaires Knobs chez les parasites traités et non traités quel que soit le temps d'incubation. Leur absence peut s'expliquer par le fait que la souche 3D7 de *P. falciparum* employée ne les exprimait plus au moment de nos travaux.
- Enfin, il a été observé chez les parasites traités, une accumulation de structures non identifiables constituées de petites vésicules peu denses et de la présence occasionnelle d'acidocalcisomes dans la vésicule digestive du parasite (Figure 51). Cette accumulation n'est pas observée dans le groupe contrôle négatif.

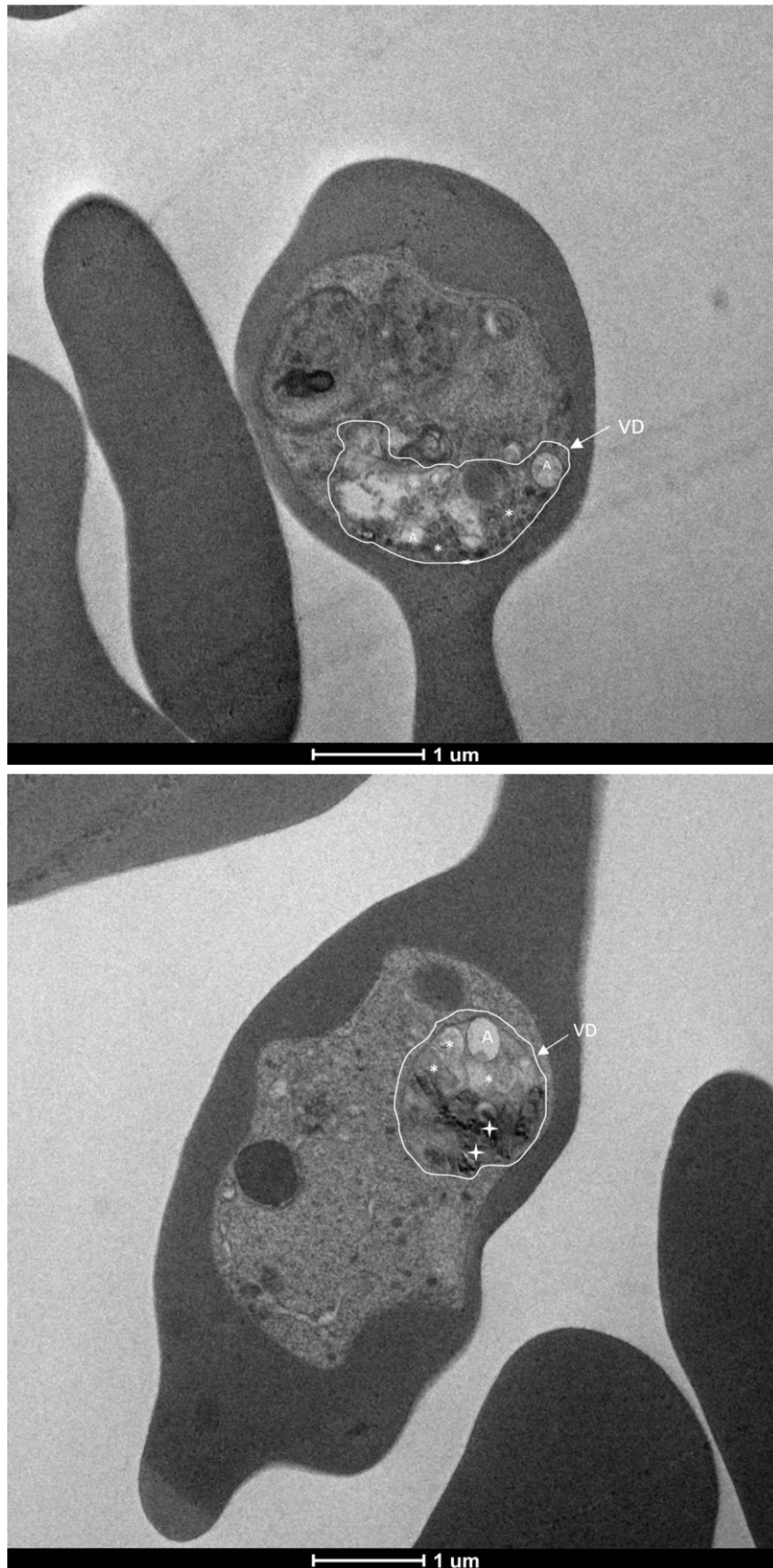


Figure 51 : Image MET de schizontes traités par doxycycline 11.6 μM à t=48h de *Plasmodium falciparum* avec anomalie de la vacuole digestive

*Légende : VD : vacuole digestive, A : acidocalcisome, * : accumulation vésicules, structures anormales, ◆ : cristal hémozoïne*

L'identification des mitochondries et des apicoplastes est difficile. Nous ne disposons pas de suffisamment d'images avec une identification certaine de ces organelles pour mettre en évidence des changements significatifs de ces organites entre les parasites traités et non traités au temps t=0h, t=12h, t=48h (Figure 52).

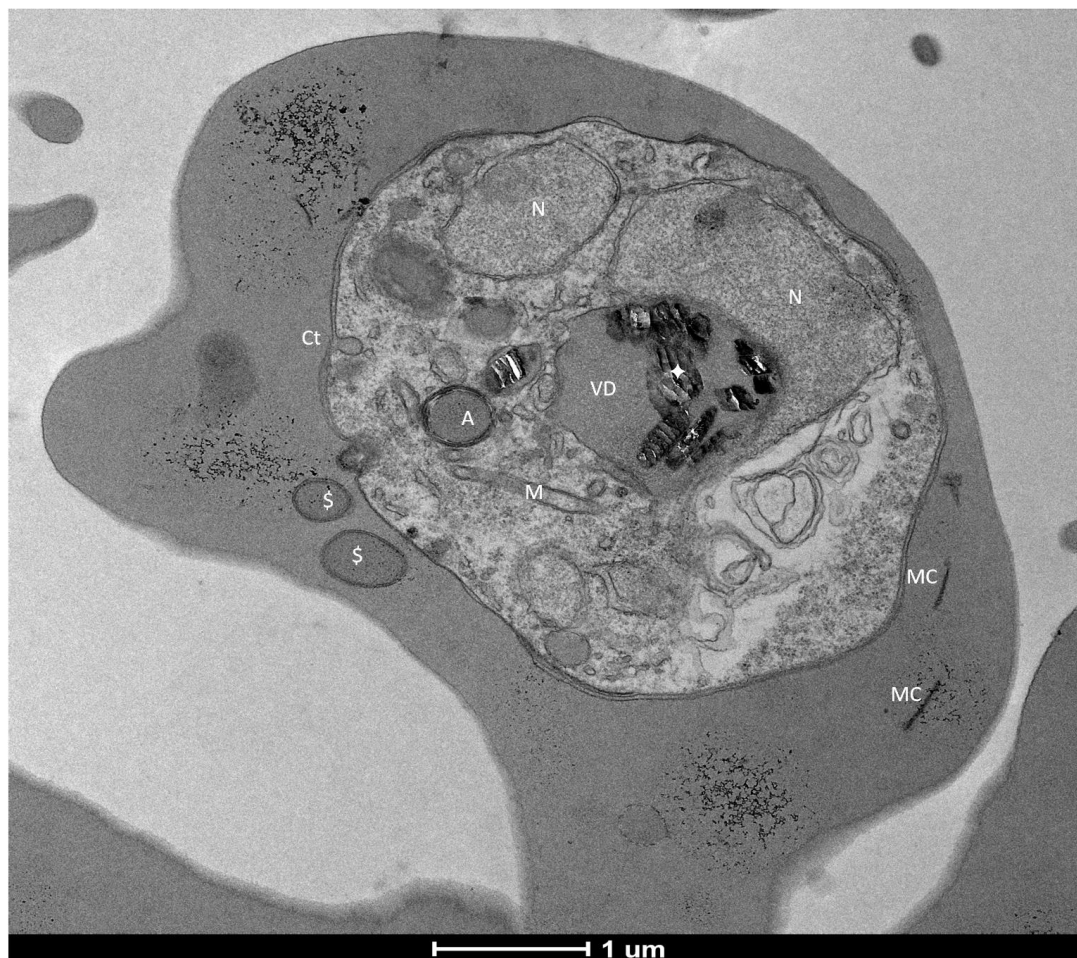


Figure 52 : Schizonte jeune de *Plasmodium falciparum* traité par doxycycline 11,6 μM à t=0h observé en MET : visualisation d'une mitochondrie

Légende : VD : vacuole digestive, A : acidocalcisome, \$ structures membraneuses extracellulaire, ◆ : cristal hémotoïne, M : mitochondrie, Ct : cytostome, MC : Tache de Maurer, N noyaux

DISCUSSION

2.3 Discussion

L'étude des données récentes de littérature sur l'action de la doxycycline sur *Plasmodium falciparum* va dans le sens d'une action multi-cibles. Les approches utilisées lors de ces études ont pu désigner certaines cibles tels que la mitochondrie, l'apicoplaste, la vacuole digestive. Les effets de la chimiothérapie sur ces organelles d'intérêt sont potentiellement visualisables en MET.

L'action de la doxycycline est soumise à des variations d'intensité selon la posologie à laquelle elle est employée. L'activité schizonticide retardée de la doxycycline à 1-3 μ M constitue un frein à son utilisation dans le traitement précoce des accès palustre. Okada et al. ont montré dans leur approche par microscopie à fluorescence que 10 μ M de doxycycline ciblait une nouvelle cible apicoplastique chez le parasite, et que ce mécanisme était responsable d'une action schizonticide rapide de premier cycle. Le gain d'activité de la doxycycline à cette posologie constitue une perspective de développement des indications de la doxycycline, mais les mécanismes de cette activité nécessitent des investigations supplémentaires (75).

Ce travail a étudié les modifications précoces ultra structurales des organelles de *Plasmodium falciparum* liées au traitement par doxycycline à la posologie de 11.6 μ M.

❖ Anomalie de premier cycle :

La principale conclusion de nos travaux est que la doxycycline 11.6 μ M semble provoquer un retard de 12 h à 24h dans le processus de maturation des schizontes du parasite dès le 1^{er} cycle parasitaire. Goodman et al. n'avaient pas visualisé de modification de morphologie du parasite sous doxycycline au cours de son 1^{er} cycle. Cependant, les auteurs se sont appuyés sur des observations par microscopie optique et microscopie à fluorescence (77).

L'approche en MET permet d'observer des changements morphologiques non réalisables par microscopie optique ou à fluorescence. Nous avons ainsi pu constater certaines altérations morphologiques du parasite traité dès le 1^{er} cycle parasitaire. Et nous avons corrélié le retard de maturation à certaines des anomalies morphologiques et fonctionnelles des organelles du parasite traité.

Dans leurs travaux de biologie moléculaire, Dahl et al. ont montré une activité retardée de la doxycycline 1 μ M liée à la perturbation des fonctions de synthèse de l'apicoplaste (73). Yeh et al. ont ensuite étudié ce mécanisme. Ils ont défini l'apicoplaste comme la cible principale de la doxycycline par la perturbation de sa fonction dans la synthèse des précurseurs

isoprénoïdes : en effet, l'ajout d'isoprénoïdes permet au parasite de survivre au traitement par la doxycycline 1 μM par (74). Okada et al. ont montré que la doxycycline pouvait avoir une action dès le 1^{er} cycle à des posologie supérieure à 10 μM par le sauvetage du parasite avec l'apport de fer exogène. Ils ont couplé cette étude à une observation par microscopie en fluorescence, et ils ont montré que ce phénomène était lié à un second mécanisme d'action de la doxycycline sur l'apicoplaste (75).

Bien que l'apicoplaste semble être une cible importante de la doxycycline, notre approche par observation direct en MET de l'apicoplaste ne nous a pas permis d'observer d'altération direct de cet organite sur les 48h de traitement à la doxycycline 11.6 μM .

Divo et al. avait suggéré que la mitochondrie pouvait être une cible potentielle de la doxycycline par la constatation de la perturbation de la chaîne respiratoire chez les parasites traités (72). Lin et al., ont montré par biologie moléculaire que les cyclines étaient responsables d'une baisse d'activité de la transcription des gènes et de la synthèse mitochondriale. Alors que la mitochondrie apparait comme une cible potentielle des cyclines selon Lin et al. et Divo et al., il ne nous a pas été possible d'objectiver de changement en MET sur la mitochondrie au cours de nos observations.

Alors que l'apicoplaste et la mitochondrie semblent être les cibles les mieux caractérisées dans la littérature, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'altération ultra structurale direct de ces 2 organelles. L'apicoplaste et la mitochondrie sont de petites organelles, et nos plans de coupes ne nous ont pas permis d'observer un suffisamment grand nombre d'entre eux, ni de les identifier assez clairement pour y objectiver des changements. Il faudrait peut-être continuer à produire des images supplémentaires pour pouvoir obtenir suffisamment de données et procéder à la constatation de modifications et d'altérations ultra structurales.

Cependant, la morphologie ultra structurale de ces organelles est basée sur des processus dynamiques et des interactions biologiques complexes, et il est probable que la visualisation de ces interactions ne soit pas possible par une approche d'observation en MET. En revanche, la visualisation d'anomalies ultra structurales d'autres organites bien qu'elles puissent être le reflet d'un mécanisme d'action direct de la doxycycline sur ces derniers pourrait aussi être le produit indirect de l'altération de l'apicoplaste ou de la mitochondrie par la doxycycline à 11.6 μM .

Sur les coupes des parasites traités nous avons observé une augmentation de nombre et de taille de structures membraneuses dans le cytoplasme des érythrocytes infectés. Nous relierions potentiellement leur présence à la perturbation du réseau apicoplastique des schizontes traités dès le 1^{er} cycle parasitaire. En effet, l'apicoplaste est impliqué dans de nombreuses voies métaboliques dont celle des acides gras composant les différentes membranes du parasite. Celui-ci relarguerait une partie des acides gras non métabolisés dans l'érythrocyte, qui par accumulation finiraient par former des structures membraneuses (Figure 44 et 45).

Une seconde hypothèse, serait que l'origine de ces membranes serait peut-être liée à un défaut d'ingestion de ces vésicules par le parasite. Cette hypothèse se base sur le fait que le contenu de ces vésicules en cours d'ingestion dans le parasite est de même densité électronique que lorsqu'on retrouve cette structure libre dans le cytosol de l'érythrocyte (Figure 44). Ces travaux ne permettent pas à ce stade de définir leur nature ni leur origine.

Au cours de nos travaux nous avons observé qu'une majorité des schizontes traités au temps=48h, présentaient une absence de vacuole digestive principale. Cette dernière prend normalement une place importante dans le parasite à son apparition au stade schizonte. La fonction principale décrite de la vacuole digestive est d'assurer la nutrition du parasite, mais elle possède aussi d'autres fonctions, notamment dans l'organisation structurale du parasite. Son absence conduit à plusieurs répercussions pour le parasite (91) (92).

Dans leur travail, Kennedy et al. ont observé une absence de VD principale chez les schizontes et trophozoïtes âgés à la concentration sérique de 50 μ M d'indolmycine (famille des cyclines) à partir du 2nd cycle parasitaire et qu'en remplacement de cette dernière, le parasite présentait de nombreuses petites vésicules digestives. (Figure 53) (78).

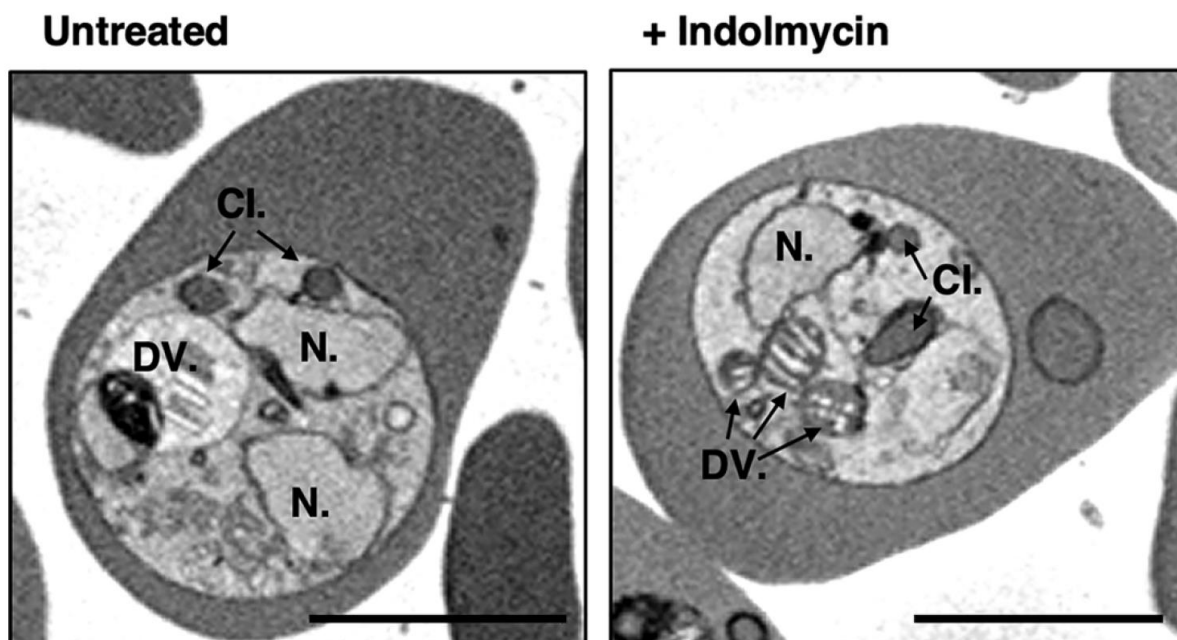


Figure 53 : Images en MET de la fragmentation de la vacuole digestive de *Plasmodium falciparum* soumis à 50 μ M d'indolmycine (78).

Légende : Barre noire = 3 μ m ; Untreated : parasite non traités ; + Indolmycine : Parasité traité par Indolmycine

N : noyaux ; Cl : invagination cytotomales ; DV : vacuole digestive

Sachanonta et al. rapportent également une fragmentation de la vacuole digestive chez *P. falciparum* sous artésunate. Néanmoins, son observation concerne le stade trophozoïte jeune dans ces travaux, chez qui il peut être normal de ne pas voir de vésicule digestive unique (113).

Les observations issues de nos travaux en MET utilisant la doxycycline rejoignent celles de Kennedy et al. en la différence que nous avons pu observer ces modifications sur les schizontes et trophozoïtes âgés dès le 1^{er} cycle du parasite soumis à 11.6 μ M de doxycycline (78).

Une de nos hypothèses est que l'absence de vacuole digestive principale entraîne un retard de croissance des parasites par une nutrition insuffisante.

Néanmoins, avant l'apparition d'une vacuole digestive principale chez le schizonte, les fonctions nutritives sont assurées par la digestion des vésicules endocytiques chez le trophozoïte. Nous avons observé au cours de nos travaux en MET que les schizontes traités possédaient plusieurs petites vésicules digestives.

Cette organisation pourrait être le résultat de la fragmentation de la vacuole digestive principale, ou d'une absence de fusion des vésicules endocytiques en vacuole digestive principale. Ces dernières semblent en partie fonctionnelles dans leurs fonctions nutritives puisqu'elles ont été capables de digérer au moins une partie l'hémoglobine et de la détoxifier

en hémozoïne comme en atteste les nombreux cristaux d'hémozoïnes visualisés chez les parasites traités.

Lors du suivi de la parasitémie par microscopie optique, nous avons observé un retard de croissance du parasite dès le 1^{er} cycle. Ce retard de croissance s'est manifesté principalement sur les schizontes à partir de t=36h et c'est poursuivi à t=48h avec une accumulation de schizontes représentant en moyenne 78% de la parasitémie totale. En parallèle du retard des schizontes, nous avons observé un ralentissement dans la progression du 2nd cycle du parasite et qui se manifestait par un retard de croissance des trophozoïtes jeunes vers la forme trophozoïte âgé qui représentait 0% de la parasitémie à t=48h.

Nous pouvons relier cette observation à l'absence de vacuole digestive principale observée en MET. Ainsi le retard de croissance des schizontes pourrait s'expliquer par une nutrition insuffisante des schizontes par les vésicules endocytiques pour assurer la croissance du parasite à son rythme normal dut à l'absence de vacuole digestive principale.

Nos observations se terminant à 48h, nous ne pouvons pas conclure quant au fait que le blocage de l'apparition d'une vacuole digestive se poursuive au-delà, ni si les petites vésicules digestives seules permettraient aux schizontes d'arriver à maturité.

La vacuole digestive, en plus de sa fonction digestive possède d'après Langreth et al. et Bannister et al. un rôle important dans l'organisation morphologique du schizonte (91) (92). D'après leurs travaux, en temps normal, les mérozoïtes s'organisent autour de la VD et y restent étroitement joints jusqu'à l'éclatement du schizonte mûr.

Lors de nos observations, une majorité des schizontes semblaient en retard sur la genèse des structures propres aux futures mérozoïtes tels que les pré-rhoptries, et les invaginations membraneuses.

Nous émettons l'hypothèse qu'en l'absence de vacuole digestive, le parasite accuse un retard dans la production et l'organisation des futures mérozoïtes. Néanmoins ce mécanisme pourrait être surmontable par le parasite puisqu'une partie des schizontes traités par 11.6µM de doxycycline ont réussi à produire des mérozoïtes bien cloisonnés à t=48h, et une autre partie ont réussi à entrer dans un 2nd cycle parasitaire.

Nous avons pu également observer à t=48h des anomalies morphologiques de la vacuole digestive sur certains schizontes qui semblaient présenter une accumulation anormale de petites vésicules denses et d'acidocalcisomes (Figure 46).

Chez les parasites non traités ces vésicules sont retrouvées dans le cytosol du parasite. Cette accumulation pourrait traduire un défaut de transport de ces dernières en dehors de la VD.

Cette hypothèse est renforcée par la présence d'acidocalcisome dans la VD alors que normalement, il est retrouvé dans le cytosol du parasite.

Nous rapportons à notre connaissance pour la première fois, une perturbation de son expression chez un parasite traité par doxycycline 11.6µM. D'après Lourido et al., l'acidocalcisome est un organite important pour le parasite pour sa participation dans la gestion du calcium et du phosphore (114) (115).

Les génomes des apicomplexes contiennent de nombreux gènes codant pour des protéines de liaison dépendantes du calcium dont notamment toute la famille des kinases. Ces études ont révélé un rôle du calcium dans la motilité du parasite, la sécrétion de micronèmes, l'invasion et la sortie des cellules hôtes et la différenciation des parasites (114) (115).

D'après Lourido et al., le calcium est en grande partie stocké chez *Plasmodium* dans les compartiments acides du parasite. Ces derniers comprennent l'acidocalcisome ainsi que la vacuole digestive. Nous rapportons au cours de nos travaux, une altération de ces 2 organites.

La doxycycline possède une action chélatrice des cations et en particulier du calcium. D'après Brion et al., l'action chélatrice de la doxycycline est majorée par un pH acide, son activité chélatrice serait d'autant plus importante dans ces organites (130).

Néanmoins Okada et al. avait étudié dans son travail si l'apport de divers ions dont celui de calcium exogène était capable de sauver le parasite de 10 µM de doxycycline. Celui-ci avait conclu que l'apport de calcium ne permettait pas de sauver le parasite. Cette approche reste discutable, car celui-ci n'a pas étudié si cette supplémentation en calcium était assimilée par le parasite.

Nous émettons l'hypothèse que la doxycycline à la posologie de 11.6 µM pourrait intervenir sur l'acidocalcisome et la vacuole digestive par la perturbation de la gestion de la chaîne du calcium et de toutes les réactions secondaires qui en dépendent. Ce mécanisme pourrait expliquer l'action multi cibles de la doxycycline.

❖ **Anomalie de second cycle :**

La seconde conclusion de nos travaux est que les parasites traités ayant réussi à produire un 2nd cycle parasitaire n'ont pas réussi à poursuivre leurs maturations jusqu'au stade trophozoïte âgé.

Nous corrélons cette absence de stade trophozoïte âgé à la baisse de la parasitémie à t=48h, comme un effet parasiticide retardée de la doxycycline sur le stade trophozoïte âgé à partir du second cycle parasitaire.

Ces résultats sont en accord avec les observations de Krungkrai et al. et Goodman et al. qui avaient clairement décrit l'effet retard parasiticide à partir du second cycle de la doxycycline

sur ce stade parasitaire(75) (76) (77) (78). D'après les auteurs, cet effet est directement dû aux répercussions de la doxycycline sur l'apicoplaste dès 1-3 μ M de doxycycline.

❖ **Perspectives :**

Lors de nos travaux nous avons pu observer l'effet retard de la doxycycline sur le 2nd cycle parasitaire. Pour rappel ce mécanisme intervient sur l'apicoplaste à partir d'une concentration en doxycycline supérieure à 1 μ M. Plusieurs trophozoïtes de 2nd cycle ont pu être observés en MET à l'issue de ce travail mais malheureusement, nous n'avons pu mettre en évidence de changements ultra structuraux associés à cet effet au cours de nos travaux.

Il serait intéressant d'observer les modifications de la vacuole digestive, de l'acidocalcisome, ainsi que des structures membraneuses extracellulaires sur un 2nd cycle par MET.

CONCLUSION

Face à la montée de la résistance de *Plasmodium falciparum* aux divers antipaludiques, le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques constitue un enjeu de santé publique mondiale important et pressant. Dans le développement de nouvelles stratégies, la doxycycline reconnue jusqu'ici pour son action retardée ne pouvait prétendre à une place de choix dans ces dernières. Les données récentes de la littérature et nos travaux en microscopie électronique à transmission montrent que cette dernière possède en plus de son action retardée, une action immédiate sur le parasite. Les mécanismes d'action de la doxycycline comprennent un défaut de second cycle retardé déjà décrit dès 1-3 μM de doxycycline dans la littérature et qui reflète l'inhibition de l'apicoplaste.

L'approche par MET dans nos travaux nous a permis de rapporter pour la première fois des altérations morphologiques de plusieurs organites du parasite dès le 1^{er} cycle parasitaire pour des concentrations de 11.6 μM de doxycycline. Les altérations touchant la vacuole digestive ainsi que l'acidocalcisome pourraient être communes et issues de la perturbation de la voie du calcium. L'atteinte de ces organites pourrait définir de nouveaux mécanismes d'action de la doxycycline. Néanmoins, notre approche par MET ne nous permet pas d'associer les différentes altérations d'organelles observées entre elles à des mécanismes d'action précis. Nos résultats ouvrent des voies nouvelles vers l'étude du mécanisme de l'altération de ces organites par d'autres approches scientifiques complémentaires.

Néanmoins, une telle concentration de doxycycline extrapolée à une posologie supérieure à celle actuellement recommandée chez l'homme ne nous permet pas de prétendre à un usage sûr en thérapie humaine. Les études pharmacocinétiques des usages courants de la doxycycline indiquent qu'une dose de 100-200 mg de doxycycline atteint des concentrations sériques humaines maximales de 6-8 μM au cours des six premières heures, qui diminuent ensuite à 1-2 μM en 24 heures. Des doses de 500 à 600 mg chez l'homme permettent d'atteindre des concentrations sériques de doxycycline supérieures à 5 μM pendant 24 à 48 heures avec peu ou pas d'augmentation des effets indésirables. L'emploi de posologies encore plus importantes conduisant à une concentration sérique de 8-10 μM de doxycycline devrait faire l'objet d'étude sur la tolérance et l'efficacité du traitement sur le parasite *in vivo* et *in vitro*.

Ces résultats suggèrent de repenser la doxycycline comme un antipaludéen à action plus rapide, multi-cibles, à dosage plus élevé supérieure à 10 μM et dont les multiples mécanismes d'action pourraient limiter l'apparition de résistance des parasites.

REFERENCES (ISO 1690)

1. <https://www.cdc.gov/malaria/about/distribution.html>
2. SINKA, Marianne E., BANGS, Michael J., MANGUIN, Sylvie, *et al.* The dominant Anopheles vectors of human malaria in Africa, Europe and the Middle East: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasites & vectors*, 2010, vol. 3, no 1, p. 117.
3. NEAFSEY, Daniel E., WATERHOUSE, Robert M., ABAI, Mohammad R., *et al.* Highly evolvable malaria vectors: the genomes of 16 Anopheles mosquitoes. *Science*, 2015, vol. 347, no 6217.
4. BOUMA, Menno Jan et DYE, Christopher. Cycles of malaria associated with El Niño in Venezuela. *Jama*, 1997, vol. 278, no 21, p. 1772-1774.
5. HEMINGWAY, Janet, FIELD, Linda, et VONTAS, John. An overview of insecticide resistance. *Science*, 2002, vol. 298, no 5591, p. 96-97.
6. RUSSELL, Tanya L., GOVELLA, Nicodem J., AZIZI, Salum, *et al.* Increased proportions of outdoor feeding among residual malaria vector populations following increased use of insecticide-treated nets in rural Tanzania. *Malaria journal*, 2011, vol. 10, no 1, p. 1-10.
7. TAKKEN, Willem et VERHULST, Niels O. Host preferences of blood-feeding mosquitoes. *Annual review of entomology*, 2013, vol. 58, p. 433-453.
8. LAMBRECHTS, Louis, MORLAIS, Isabelle, AWONO-AMBENE, Parfait H., *et al.* Effect of infection by Plasmodium falciparum on the melanization immune response of Anopheles gambiae. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 2007, vol. 76, no 3, p. 475-480.
9. <http://campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/paludisme/site/html/imagess/f05-03-9782294748394.JPEG>
10. CHIN, William, CONTACOS, Peter G., COATNEY, G. Robert, *et al.* A naturally acquired quotidian-type malaria in man transferable to monkeys. *Science*, 1965, vol. 149, no 3686, p. 865-865.
11. VYTHILINGAM, Indra, NOORAZIAN, Yusuf M., HUAT, Tan Cheong, *et al.* Plasmodium knowlesi in humans, macaques and mosquitoes in peninsular Malaysia. *Parasites & vectors*, 2008, vol. 1, no 1, p. 26.
12. PINA-COSTA, Anielle de, BRASIL, Patrícia, SANTI, Sílvia Maria Di, *et al.* Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2014, vol. 109, no 5, p. 618-633.
13. <http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/ImageLibrary/>
14. World malaria report 2020: 20 years of global progress and challenges. Geneva: World Health Organization; 2020.

15. DONDORP, Arjen M., NOSTEN, François, YI, Poravuth, *et al.* Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *New England Journal of Medicine*, 2009, vol. 361, no 5, p. 455-467.
16. <https://cnr-paludisme.fr/activites-dexpertise/rapports-dactivites/>
17. Recommandations de la Société de pathologie infectieuse de langue française (SPILF). Prise en charge et prévention du paludisme d'importation. Mise à jour 2017 des RPC 2007. www.infectiologie.com/UserFiles/File/spilf/recos/2017-palu-texte-final-flash.pdf.
18. GILLET, Philippe, MORI, Marcella, VAN ESBROECK, Marjan, *et al.* Assessment of the prozone effect in malaria rapid diagnostic tests. *Malaria journal*, 2009, vol. 8, no 1, p. 1-7.
19. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Malaria diagnostics technology and market landscape. Geneva: WHO; 2014.
20. HARRIS, Ivor, SHARROCK, Wesley W., BAIN, Lisa M., *et al.* A large proportion of asymptomatic *Plasmodium* infections with low and sub-microscopic parasite densities in the low transmission setting of Temotu Province, Solomon Islands: challenges for malaria diagnostics in an elimination setting. *Malaria journal*, 2010, vol. 9, no 1, p. 254.
21. MOUATCHO, Joel C. et GOLDRING, JP Dean. Malaria rapid diagnostic tests: challenges and prospects. *Journal of medical microbiology*, 2013, vol. 62, no 10, p. 1491-1505.
22. GAMBOA, Dionicia, HO, Mei-Fong, BENDEZU, Jorge, *et al.* A large proportion of *P. falciparum* isolates in the Amazon region of Peru lack *pfhrp2* and *pfhrp3*: implications for malaria rapid diagnostic tests. *PLoS one*, 2010, vol. 5, no 1, p. e8091.
23. CHENG, Qin, GATTON, Michelle L., BARNWELL, John, *et al.* *Plasmodium falciparum* parasites lacking histidine-rich protein 2 and 3: a review and recommendations for accurate reporting. *Malaria journal*, 2014, vol. 13, no 1, p. 283.
24. BLASCO, Benjamin, LEROY, Didier, et FIDOCK, David A. Antimalarial drug resistance: linking *Plasmodium falciparum* parasite biology to the clinic. *Nature medicine*, 2017, vol. 23, no 8, p. 917.
25. GREENWOOD, Brian. Intermittent preventive treatment—a new approach to the prevention of malaria in children in areas with seasonal malaria transmission. *Tropical medicine & international health*, 2006, vol. 11, no 7, p. 983-991.
26. IMBODEN JR, C. A., COOPER, W. C., COATNEY, G. R., *et al.* Studies in human malaria. XXIX. Trials of aureomycin, chloramphenicol, penicillin, and dihydrostreptomycin against the Chesson strain of *Plasmodium vivax*. *Journal of the National Malaria Society*, 1950, vol. 9, no 4, p. 377-80.
27. SANCHEZ, F. Ruiz, CASILLAS, J., PAREDES, M., *et al.* Terramycin in malaria therapy. *Pan American medical woman's journal*, 1952, vol. 59, no 2, p. 10-15.

28. RUIZ SANCHEZ, F., RUIZ SANCHEZ, A., NARANJO GRANDE, E., *et al.* The treatment of malaria with tetracycline. *Antibiotic Med.*, 1956, vol. 3, no 3, p. 193-6.
29. WILLERSON JR, D., RIECKMANN, K. H., CARSON, P. E., *et al.* Effects of minocycline against chloroquine-resistant falciparum malaria. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 1972, vol. 21, no 6, p. 857-862.
30. CLYDE, D. F., MILLER, R. M., DUPONT, H. L., *et al.* Antimalarial effects of tetracyclines in man. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1971, vol. 74, no 11, p. 238-42.
31. NEWTON, Paul N., CHAULET, Jean-François, BROCKMAN, Alan, *et al.* Pharmacokinetics of oral doxycycline during combination treatment of severe falciparum malaria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2005, vol. 49, no 4, p. 1622-1625.
32. BERGER, Richard S. A double-blind, multiple-dose, placebo-controlled, cross-over study to compare the incidence of gastrointestinal complaints in healthy subjects given Doryx R and Vibramycin R. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 1988, vol. 28, no 4, p. 367-370.
33. STORY, M. J., MCCLOUD, P. I., et BOEHM, G. Doxycycline tolerance study. *European journal of clinical pharmacology*, 1991, vol. 40, no 4, p. 419-421.
34. PAGES, Frédéric, BOUTIN, Jean-Paul, MEYNARD, Jean-Baptiste, *et al.* Tolerability of doxycycline monohydrate salt vs. chloroquine-proguanil in malaria chemoprophylaxis. *Tropical Medicine & International Health*, 2002, vol. 7, no 11, p. 919-924.
35. TAN, Kathrine R., MAGILL, Alan J., PARISE, Monica E., *et al.* Doxycycline for malaria chemoprophylaxis and treatment: report from the CDC expert meeting on malaria chemoprophylaxis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 2011, vol. 84, no 4, p. 517-531.
36. RIECKMANN, K. H., POWELL, R. D., MCNAMARA, J. V., *et al.* Effects of tetracycline against chloroquine-resistant and chloroquine-sensitive Plasmodium falciparum. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 1971, vol. 20, no 6, p. 811-815.
37. COLWELL, Edward J., HICKMAN, Robert L., et KOSAKAL, Sanong. Tetracycline treatment of chloroquine-resistant falciparum malaria in Thailand. *Jama*, 1972, vol. 220, no 5, p. 684-686.
38. HANDFIELD-JONES, R. P. C. Chloroquine, proguanil, mepacrine and quinine in the treatment of malaria caused by Plasmodium falciparum. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 1949, vol. 43, no 3-4, p. 345-348.
39. WHITE, N. J. Assessment of the pharmacodynamic properties of antimalarial drugs in vivo. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1997, vol. 41, no 7, p. 1413.
40. MARLIN, G. E. et CHENG, S. PHARMACOKINETICS AND TOLERABILITY OF A SINGLE ORAL 600-mg DOSE OF DOXYCYCLINE. *Medical Journal of Australia*, 1979, vol. 1, no 12, p. 575-576.

41. ADADEVOH, B. Kwaku, OGUNNAIKE, I. A., et BOLODEOKU, J. O. Serum levels of doxycycline in normal subjects after a single oral dose. *British medical journal*, 1976, vol. 1, no 6014, p. 880.
42. LOOAREESUWAN, S., VANIJANONTA, S., VIRAVAN, C., *et al.* Randomised trial of mefloquine-tetracycline and quinine-tetracycline for acute uncomplicated falciparum malaria. *Acta tropica*, 1994, vol. 57, no 1, p. 47-53.
43. WATT, George, LOESUTTIVIBOOL, Lersan, SHANKS, G. Dennis, *et al.* Quinine with tetracycline for the treatment of drug-resistant falciparum malaria in Thailand. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 1992, vol. 47, no 1, p. 108-111.
44. REACHER, Mark, FREEMAN, John, CAMPBELL, CarlosC, *et al.* Drug therapy for Plasmodium falciparum malaria resistant to pyrimethamine-sulfadoxine (Fansidar): A study of alternate regimens in Eastern Thailand, 1980. *The Lancet*, 1981, vol. 318, no 8255, p. 1066-1069.
45. TAYLOR, W. R., WIDJAJA, H., RICHIE, T. L., *et al.* Chloroquine/doxycycline combination versus chloroquine alone, and doxycycline alone for the treatment of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax malaria in northeastern Irian Jaya, Indonesia. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 2001, vol. 64, no 5, p. 223-228.
46. ANDERSEN, S. L., OLOO, A. J., GORDON, D. M., *et al.* Successful double-blinded, randomized, placebo-controlled field trial of azithromycin and doxycycline as prophylaxis for malaria in Western Ken. *Clinical infectious diseases*, 1998, vol. 26, no 1, p. 146-150.
47. WEISS, Walter R., OLOO, Aggrey J., JOHNSON, Anthony, *et al.* Daily primaquine is effective for prophylaxis against falciparum malaria in Kenya: comparison with mefloquine, doxycycline, and chloroquine plus proguanil. *Journal of Infectious Diseases*, 1995, vol. 171, no 6, p. 1569-1575.
48. TAYLOR, Walter RJ, RICHIE, Thomas L., FRYAUFF, David J., *et al.* Malaria prophylaxis using azithromycin: a double-blind, placebo-controlled trial in Irian Jaya, Indonesia. *Clinical infectious diseases*, 1999, vol. 28, no 1, p. 74-81.
49. OHRT, Colin, RICHIE, Thomas L., WIDJAJA, Hendra, *et al.* Mefloquine compared with doxycycline for the prophylaxis of malaria in Indonesian soldiers: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Annals of Internal Medicine*, 1997, vol. 126, no 12, p. 963-972.
50. BRYAN, Joe P. Cost considerations of malaria chemoprophylaxis including use of primaquine for primary or terminal chemoprophylaxis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 2006, vol. 75, no 3, p. 416-420.
51. OHRT, Colin, RICHIE, Thomas L., WIDJAJA, Hendra, *et al.* Mefloquine compared with doxycycline for the prophylaxis of malaria in Indonesian soldiers: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Annals of Internal Medicine*, 1997, vol. 126, no 12, p. 963-972.

52. BRIOLANT, Sébastien, WURTZ, Nathalie, ZETTOR, Agnès, *et al.* Susceptibility of *Plasmodium falciparum* isolates to doxycycline is associated with pftetQ sequence polymorphisms and pftetQ and pfmdt copy numbers. *The Journal of infectious diseases*, 2010, vol. 201, no 1, p. 153-159.
53. NEELY, JEFFREY L., ABATE, MARIE, SWINKER, MARIAN, *et al.* The effect of doxycycline on serum levels of ethinyl estradiol, norethindrone, and endogenous progesterone. *Obstetrics and gynecology*, 1991, vol. 77, no 3, p. 416-420.
54. ARCHER, Johanna SM et ARCHER, David F. Oral contraceptive efficacy and antibiotic interaction: a myth debunked. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2002, vol. 46, no 6, p. 917-923.
55. BACIEWICZ, Anne M. et BAL, Baljit S. Bleeding associated with doxycycline and warfarin treatment. *Archives of internal medicine*, 2001, vol. 161, no 9, p. 1231-1231.
56. KUZUCU, Ethem Y. Methoxyflurane, tetracycline, and renal failure. *JAMA*, 1970, vol. 211, no 7, p. 1162-1164.
57. COUSINS, MichaelJ et MAZZE, RichardI. Tetracycline, methoxyflurane anaesthesia, and renal dysfunction. *The Lancet*, 1972, vol. 299, no 7753, p. 751-752.
58. FRASCINO, JosephA. Tetracycline, methoxyflurane anaesthesia, and renal dysfunction. *The Lancet*, 1972, vol. 299, no 7760, p. 1127.
59. LAYTON, A. M. et CUNLIFFE, W. J. Phototoxic eruptions due to doxycycline—a dose-related phenomenon. *Clinical and experimental dermatology*, 1993, vol. 18, no 5, p. 425-427.
60. TANZMAN, Esther S. Long-Term Tetracycline Use in the Treatment of Acne Vulgaris—The Role of Routine Laboratory Monitoring. *Journal of American College Health*, 1988, vol. 36, no 5, p. 272-278.
61. SAUER, Gordon C. Safety of long-term tetracycline therapy for acne. *Archives of dermatology*, 1976, vol. 112, no 11, p. 1603-1605.
62. JAWETZ, E., GUNNISON, J. B., *et al.* Studies on Antibiotic Synergism and Antagonism: a Scheme of Combined Antibiotic Action. *Antibiotics & Chemotherapy*, 1952, vol. 2, no 5, p. 243-8.
63. LINDENBAUM, John, RUND, Deborah G., BUTLER JR, Vincent P., *et al.* Inactivation of digoxin by the gut flora: reversal by antibiotic therapy. *New England Journal of Medicine*, 1981, vol. 305, no 14, p. 789-794.
64. STAINMESSE, M., ALETTI, M., VANDERPERRE, G., *et al.* Doxycycline: un nouveau cas d'hypertension intracrânienne. *La Revue de Médecine Interne*, 2016, vol. 37, p. A231-A232.
65. GAILLARD, Tiphaine, BOXBERGER, Manon, MADAMET, Marylin, *et al.* Has doxycycline, in combination with anti-malarial drugs, a role to play in intermittent preventive treatment of *Plasmodium falciparum* malaria infection in pregnant women in Africa?. *Malaria journal*, 2018, vol. 17, no 1, p. 1-6.

66. SCHLAGENHAUF, Patricia, TSCHOPP, Alois, JOHNSON, Richard, *et al.* Tolerability of malaria chemoprophylaxis in non-immune travellers to sub-Saharan Africa: multicentre, randomised, double blind, four arm study. *Bmj*, 2003, vol. 327, no 7423, p. 1078.
67. ARTHUR, James D., ECHEVERRIA, Peter, SHANKS, G. Dennis, *et al.* A comparative study of gastrointestinal infections in United States soldiers receiving doxycycline or mefloquine for malaria prophylaxis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 1990, vol. 43, no 6, p. 608-613.
68. CROSS, Ruby, LING, Clare, DAY, Nicholas PJ, *et al.* Revisiting doxycycline in pregnancy and early childhood—time to rebuild its reputation?. *Expert opinion on drug safety*, 2016, vol. 15, no 3, p. 367-382.
69. TODD, Suzanne R., DAHLGREN, F. Scott, TRAEGER, Marc S., *et al.* No visible dental staining in children treated with doxycycline for suspected Rocky Mountain spotted fever. *The Journal of pediatrics*, 2015, vol. 166, no 5, p. 1246-1251.
70. NEUVONEN, P. J., PENTTILÄ, O., LEHTOVAARA, R., *et al.* Effect of antiepileptic drugs on the elimination of various tetracycline derivatives. *European journal of clinical pharmacology*, 1975, vol. 9, no 2, p. 147-154.
71. TANAKA, N. Inhibition of protein synthesis by antibiotics. *Tanpakushitsu kakusan koso. Protein, nucleic acid, enzyme*, 1965, vol. 10, no 13, p. 1321-1329.
72. DIVO, ALAN A., GEARY, TIMOTHY G., et JENSEN, JAMES B. Oxygen-and time-dependent effects of antibiotics and selected mitochondrial inhibitors on Plasmodium falciparum in culture. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1985, vol. 27, no 1, p. 21-27.
73. DAHL, Erica L., SHOCK, Jennifer L., SHENAI, Bhaskar R., *et al.* Tetracyclines specifically target the apicoplast of the malaria parasite Plasmodium falciparum. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2006, vol. 50, no 9, p. 3124-3131.
74. YEH, Ellen et DERISI, Joseph L. Chemical rescue of malaria parasites lacking an apicoplast defines organelle function in blood-stage Plasmodium falciparum. *PLoS biology*, 2011, vol. 9, no 8, p. e1001138.
75. OKADA, Megan, GUO, Ping, NALDER, Shai-anne, *et al.* Doxycycline has distinct apicoplast-specific mechanisms of antimalarial activity. *Elife*, 2020, vol. 9, p. e60246.
76. KRUNGKRAI, J., PRAPUNWATTANA, P., et KRUNGKRAI, S. R. Ultrastructure and function of mitochondria in gametocytic stage of Plasmodium falciparum. *Parasite*, 2000, vol. 7, no 1, p. 19-26.
77. GOODMAN, Christopher Dean, SU, Vanessa, et MCFADDEN, Geoffrey I. The effects of anti-bacterials on the malaria parasite Plasmodium falciparum. *Molecular and biochemical parasitology*, 2007, vol. 152, no 2, p. 181-191.

78. KENNEDY, Kit, COBBOLD, Simon A., HANSSSEN, Eric, *et al.* Delayed death in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* is caused by disruption of prenylation-dependent intracellular trafficking. *PLoS biology*, 2019, vol. 17, no 7, p. e3000376.
79. FEAGIN, J. E. Exploring the organelle genomes of malaria parasites. *MBL LECTURES IN BIOLOGY*, 1995, vol. 12, p. 163-163.
80. YEO, Anthony ET, RIECKMANN, K. H., et CHRISTOPHERSON, R. I. Indirect inhibition by antibiotics of nucleotide and deoxynucleotide biosynthesis in *Plasmodium falciparum*. *Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, 1998, vol. 29, p. 24-26.
81. GEARY, Timothy G., DIVO, Alan A., et JENSEN, James B. Stage specific actions of antimalarial drugs on *Plasmodium falciparum* in culture. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 1989, vol. 40, no 3, p. 240-244.
82. GOODHEW, Peter J. et HUMPHREYS, John. *Electron microscopy and analysis*. CRC Press, 2000.
83. RANSON, Neil A., CLARE, Daniel K., FARR, George W., *et al.* Allosteric signaling of ATP hydrolysis in GroEL–GroES complexes. *Nature structural & molecular biology*, 2006, vol. 13, no 2, p. 147-152.
84. SAN MARTÍN, Carmen, BURNETT, Roger M., DE HAAS, Felix, *et al.* Combined EM/X-ray imaging yields a quasi-atomic model of the adenovirus-related bacteriophage PRD1 and shows key capsid and membrane interactions. *Structure*, 2001, vol. 9, no 10, p. 917-930.
85. <https://www.stem.lps.u-psud.fr/la-microscopie-electronique>
86. HARRIS, J. Robin. Negative staining and cryoelectron microscopy. *Microscopy Today*, 1997, vol. 5, no 1, p. 18-18.
87. <https://mssmat.centralesupelec.fr/en/Moyens-microscopie-principes-met>
88. https://trigenotoul.com/ressources/electronique_super_resolue/met/
89. VULOVIC, M., RIEGER, B., VAN VLIET, L. J., *et al.* A toolkit for the characterization of CCD cameras for transmission electron microscopy. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 2010, vol. 66, no 1, p. 97-109.
90. KIM, Young-Min, LEE, Jeong Yong, MOONEN, Daniel, *et al.* Quantitative evaluations of a high-voltage multiscan CCD camera. *Journal of electron microscopy*, 2007, vol. 56, no 6, p. 217-224.
91. BANNISTER, L. H., HOPKINS, J. M., FOWLER, R. E., *et al.* A brief illustrated guide to the ultrastructure of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *Parasitology today*, 2000, vol. 16, no 10, p. 427-433.
92. LANGRETH, Susan G., JENSEN, James B., REESE, Robert T., *et al.* Fine structure of human malaria in vitro. *The Journal of protozoology*, 1978, vol. 25, no 4, p. 443-452.

93. LADDA, R.L. et al. (1969) Penetration of erythrocytes by merozoites of mammalian and avian malarial parasites. *J. Parasitol.* 55: 633–644
94. BANNISTER, L. H., MITCHELL, G. H., BUTCHER, G. A., *et al.* Structure and development of the surface coat of erythrocytic merozoites of *Plasmodium knowlesi*. *Cell and tissue research*, 1986, vol. 245, no 2, p. 281-290.
95. AIKAWA Masamichi and STERLING Charles R. (1974) Intracellular parasitic protozoa. Academic Press, 1974.
96. BANNISTER, L.H. and MITCHELL, G.H. (1995) The role of the cytoskeleton in *Plasmodium falciparum* merozoite biology: an electron-microscopic view. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 89, 105–111
97. SLOMIANNY, C. et PRENSIER, G. Application of the serial sectioning and tridimensional reconstruction techniques to the morphological study of the *Plasmodium falciparum* mitochondrion. *The Journal of parasitology*, 1986, p. 595-598.
98. BANNISTER, L. H., HOPKINS, J. M., FOWLER, R. E., *et al.* Ultrastructure of rhoptry development in *Plasmodium falciparum* erythrocytic schizonts. *Parasitology*, 2000, vol. 121, no 3, p. 273-287.
99. SAM-YELLOWE, TOBILI Y., FUJIOKA, HISHASHI, AIKAWA, MASAMICHI, *et al.* *Plasmodium falciparum* rhoptry proteins of 140/130/110 kd (Rhop-H) are located in an electron lucent compartment in the neck of the rhoptries. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 1995, vol. 42, no 3, p. 224-231.
100. SAM-YELLOWE, T. Y. Rhoptry organelles of the apicomplexa: their role in host cell invasion and intracellular survival. *Parasitology Today*, 1996, vol. 12, no 8, p. 308-316.
101. WARD, Gary E., FUJIOKA, Hisashi, AIKAWA, Masamichi, *et al.* Staurosporine inhibits invasion of erythrocytes by malarial merozoites. *Experimental parasitology*, 1994, vol. 79, no 3, p. 480-487.
102. ATKINSON, C. T. et AIKAWA, M. Ultrastructure of malaria-infected erythrocytes. *Blood cells*, 1990, vol. 16, no 2-3, p. 351-368.
103. HANSSSEN, Eric, MCMILLAN, Paul J., et TILLEY, Leann. Cellular architecture of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *International journal for parasitology*, 2010, vol. 40, no 10, p. 1127-1135.
104. LIN, Qinghua, KATAKURA, Ken, et SUZUKI, Mamoru. Inhibition of mitochondrial and plastid activity of *Plasmodium falciparum* by minocycline. *FEBS letters*, 2002, vol. 515, no 1-3, p. 71-74.
105. DENNY, Paul W., PREISER, Peter R., RANGACHARI, Kaveri, *et al.* Complete Gene Map of the Plastid-like DNA of the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *Journal of molecular biology*, 1996, vol. 261, no 2, p. 155-172.
106. KÖHLER, Sabine, DELWICHE, Charles F., DENNY, Paul W., *et al.* A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites. *Science*, 1997, vol. 275, no 5305, p. 1485-1489.

107. WILLIAMSON, D. H., PREISER, P. R., MOORE, P. W., *et al.* The plastid DNA of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* is replicated by two mechanisms. *Molecular microbiology*, 2002, vol. 45, no 2, p. 533-542.
108. ABU Bakar, N.A., KLONIS, N., HANSSSEN, E., CHAN, C., TILLEY, L., 2010. Digestive-vacuole genesis and endocytic processes in the early intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *J. Cell Sci.* 123, 441–450.
109. STENZEL, D. J. et KARA, U. A. Sorting of malarial antigens into vesicular compartments within the host cell cytoplasm as demonstrated by immunoelectron microscopy. *European journal of cell biology*, 1989, vol. 49, no 2, p. 311-318.
110. AIKAWA, Masamichi, HUFF, Clay G., et SPRINZ, Helmuth. Fine structure of the asexual stages of *Plasmodium elongatum*. *The Journal of cell biology*, 1967, vol. 34, no 1, p. 229-249.
111. DE SOUZA, Wanderley. Structural organization of the cell surface of pathogenic protozoa. *Micron*, 1995, vol. 26, no 5, p. 405-430.
112. SLATER, A. F., SWIGGARD, William J., ORTON, Brian R., *et al.* An iron-carboxylate bond links the heme units of malaria pigment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1991, vol. 88, no 2, p. 325-329.
113. SACHANONTA, Navakanit, CHOTIVANICH, Kesinee, CHAISRI, Urai, *et al.* Ultrastructural and real-time microscopic changes in *P. falciparum*-infected red blood cells following treatment with antimalarial drugs. *Ultrastructural pathology*, 2011, vol. 35, no 5, p. 214-225.
114. RUIZ, Felix A., LUO, Shuhong, MORENO, Silvia NJ, *et al.* Polyphosphate content and fine structure of acidocalcisomes of *Plasmodium falciparum*. *Microscopy and Microanalysis*, 2004, vol. 10, no 5, p. 563-567
115. LOURIDO, Sebastian et MORENO, Silvia NJ. The calcium signaling toolkit of the Apicomplexan parasites *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium* spp. *Cell calcium*, 2015, vol. 57, no 3, p. 186-193.
116. TARASCHI, Theodore F., TRELKA, Darin, SCHNEIDER, Timothy, *et al.* *Plasmodium falciparum*: characterization of organelle migration during merozoite morphogenesis in asexual malaria infections. *Experimental parasitology*, 1998, vol. 88, no 3, p. 184-193.
117. LANZER, Michael, WICKERT, Hannes, KROHNE, Georg, *et al.* Maurer's clefts: a novel multi-functional organelle in the cytoplasm of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *International journal for parasitology*, 2006, vol. 36, no 1, p. 23-36.
118. TAYLOR, Diane W., PARRA, Marcela, CHAPMAN, George B., *et al.* Localization of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 1 in the erythrocyte skeleton under knobs. *Molecular and biochemical parasitology*, 1987, vol. 25, no 2, p. 165-174.
119. KILEJIAN, Araxie. Characterization of a protein correlated with the production of knob-like protrusions on membranes of erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1979, vol. 76, no 9, p. 4650-4653.

120. TRELKA, Darin P., SCHNEIDER, Timothy G., REEDER, John C., *et al.* Evidence for vesicle-mediated trafficking of parasite proteins to the host cell cytosol and erythrocyte surface membrane in *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. *Molecular and biochemical parasitology*, 2000, vol. 106, no 1, p. 131-145.
121. WICKERT, Hannes et KROHNE, Georg. The complex morphology of Maurer's clefts: from discovery to three-dimensional reconstructions. *Trends in parasitology*, 2007, vol. 23, no 10, p. 502-509.
122. WICKHAM, Mark E., RUG, Melanie, RALPH, Stuart A., *et al.* Trafficking and assembly of the cytoadherence complex in *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes. *The EMBO journal*, 2001, vol. 20, no 20, p. 5636-5649.
123. HANSSEN, Eric, SOUGRAT, Rachid, FRANKLAND, Sarah, *et al.* Electron tomography of the Maurer's cleft organelles of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes reveals novel structural features. *Molecular microbiology*, 2008, vol. 67, no 4, p. 703-718.
124. FREEMAN, R.R. and HOLDER, A. A. Light microscope morphology of *Plasmodium falciparum* during a synchronized growth cycle in vitro. *Ann Trop Med Parasitol.* 1983, vol. 77, no 1, p. 95-96.
125. LORIA, Paul, MILLER, Susanne, FOLEY, Michael, *et al.* Inhibition of the peroxidative degradation of haem as the basis of action of chloroquine and other quinoline antimalarials. *Biochemical Journal*, 1999, vol. 339, no 2, p. 363-370.
126. NAGAO, Eriko, KANEKO, Osamu, et DVORAK, James A. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes: qualitative and quantitative analyses of parasite-induced knobs by atomic force microscopy. *Journal of structural biology*, 2000, vol. 130, no 1, p. 34-44.
127. JAIKARIA, Navdeep S., ROZARIO, Catherine, RIDLEY, Robert G., *et al.* Biogenesis of rhoptry organelles in *Plasmodium falciparum*. *Molecular and biochemical parasitology*, 1993, vol. 57, no 2, p. 269-279.
128. VAN DOOREN, Giel G., MARTI, Matthias, TONKIN, Christopher J., *et al.* Development of the endoplasmic reticulum, mitochondrion and apicoplast during the asexual life cycle of *Plasmodium falciparum*. *Molecular microbiology*, 2005, vol. 57, no 2, p. 405-419.
129. TRAGER, William et JENSEN, James B. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, 1976, vol. 193, no 4254, p. 673-675.
130. KADDOURI, Halima, NAKACHE, Serge, HOUZÉ, Sandrine, *et al.* Assessment of the drug susceptibility of *Plasmodium falciparum* clinical isolates from Africa by using a *Plasmodium* lactate dehydrogenase immunodetection assay and an inhibitory maximum effect model for precise measurement of the 50-percent inhibitory concentration. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2006, vol. 50, no 10, p. 3343-3349.
131. LE NAGARD H, VINCENT C, MENTRÉ F, LE BRAS J: Online analysis of in vitro resistance to antimalarial drugs through nonlinear regression. *Comput Methods Programs Biomed* 2010.

132. BACON, David J., JAMBOU, Ronan, FANDEUR, Thierry, *et al.* World Antimalarial Resistance Network (WARN) II: in vitro antimalarial drug susceptibility. *Malaria journal*, 2007, vol. 6, no 1, p. 1-8.

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence de mes maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

- ❖ D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- ❖ D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- ❖ De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.*
- ❖ En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre, méprisé de mes confrères, si j'y manque.

Résumé de la thèse

La doxycycline est un antibiotique de la famille des cyclines, et est active sur *Plasmodium falciparum*, agent du paludisme. Ses mécanismes d'actions sont imparfaitement élucidés, limitant son usage en traitement curatif des accès palustres.

A la posologie standard de 1 μM , elle possède une action schizonticide puissante à partir du second cycle parasitaire. Des études récentes ont démontré que cette activité à 1 μM passait par le blocage de l'apicoplaste chez le parasite ainsi que la mitochondrie.

D'autres travaux ont montré que la doxycycline à 10 μM aurait une action dès le premier cycle. Cette activité impliquerait également l'apicoplaste mais par un autre mécanisme d'action. Cet effet précoce pourrait permettre d'élargir les indications anti-palustres de la doxycycline.

Ce travail a étudié les modifications précoces de premier cycle de *Plasmodium falciparum* soumis à 10 μM de doxycycline en exploitant la microscopie électronique à transmission. Cette approche nous a permis de caractériser des modifications ultra structurales du parasite et de ces organelles. Parmi nos observations, nous avons constaté un retard de croissance important au cours du premier cycle du parasite corrélé à des anomalies morphologiques ultra structurales du stade schizonte. Nous avons retrouvé une absence de vacuole digestive du parasite, la séquestration de petites vésicules et d'acidocalcisome dans la vésicule digestive, ainsi que la multiplication de structures membraneuses extra parasitaires dans les hématies parasitées.

Ces résultats suggèrent de repenser la doxycycline comme un antipaludéen à action rapide, multi cibles à concentration supérieure à 10 μM .

MOT-CLÉS :

Paludisme, *Plasmodium falciparum*, microscopie électronique à transmission, modifications ultra structurales, 10 μM de doxycycline, effet précoce, apicoplaste, acidocalcisome, vacuole digestive, mitochondrie, structure membraneuse extra-parasitaires.