VETAGRO SUPCAMPUS VÉTÉRINAIRE DE LYON

Année 2011

Les modèles pour l'évaluation *in vivo* des molécules antipaludiques.

Développement d'un test d'efficacité chez le singe écureuil (Saimiri sciureus).

THÈSE

Présentée à l'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON I (Médecine - Pharmacie) et soutenue publiquement le 9 décembre 2011 pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

Clément Grandin né le 12 août 1986 à Caen (Calvados)





VETAGRO SUP

CAMPUS VÉTÉRINAIRE DE LYON

Année 2011

Les modèles pour l'évaluation *in vivo* des molécules antipaludiques.

Développement d'un test d'efficacité chez le singe écureuil (Saimiri sciureus).

THÈSE

Présentée à l'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON I (Médecine - Pharmacie) et soutenue publiquement le 9 décembre 2011 pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

Clément Grandin né le 12 août 1986 à Caen (Calvados)





VetAgro Sup – Campus vétérinaire de Lyon Liste du corps enseignant

NOM	Prénom	Grade	Unité Pédagogique
ALOGNINOUWA	Théodore	Professeur 1ere cl	Pathologie du bétail
ALVES-DE-OLIVEIRA	Laurent	Maître de conférences hors cl	Gestion des élevages
ARCANGIOLI	Marie-Anne	Maître de conférences cl normale	Pathologie du bétail
ARTOIS	Marc	Professeur 1ere cl	Santé Publique et Vétérinaire
BECKER	Claire	Maître de conférences cl normale	Pathologie du bétail
BELLI	Patrick	Maître de conférences associé	Pathologie morphologique et clinique
BELLUCO	Sara	Maître de conférences cl normale	Pathologie morphologique et clinique
BENAMOU-SMITH	Agnès	Maître de conférences cl normale	Equine
BENOIT	Etienne	Professeur 1ere cl	Biologie fonctionnelle
BERNY	Philippe	Professeur 1ere cl	Biologie fonctionnelle
BONNET-GARIN	Jeanne-Marie	Professeur 2eme cl	Biologie fonctionnelle
BOULOCHER	Caroline	Maître de conférences cl normale	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
BOURDOISEAU	Gilles	Professeur 1ere cl	Santé Publique et Vétérinaire
BOURGOIN	Gilles	Maître de conférences cl normale	Santé Publique et Vétérinaire
BRUYERE	Pierre	Maître de conférences Contractuel	Biotechnologies et pathologie de la reproduction
BUFF	Samuel	Maître de conférences cl normale	Biotechnologies et pathologie de la reproduction
BURONFOSSE	Thierry	Maître de conférences hors cl	Biologie fonctionnelle
CACHON	Thibaut	Maître de conférences Contractuel	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
CADORE	Jean-Luc	Professeur 1ere cl	Pathologie médicale des animaux de compagnie
CALLAIT-CARDINAL	Marie-Pierre	Maître de conférences cl normale	Santé Publique et Vétérinaire
CAROZZO	Claude	Maître de conférences cl normale	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
CHABANNE	Luc	Professeur 1ere cl	Pathologie médicale des animaux de compagnie
CHALVET-MONFRAY	Karine	Maître de conférences hors cl	Biologie fonctionnelle
COMMUN	Loic	Maître de conférences cl normale	Gestion des élevages
DELIGNETTE-MULLER	Marie-Laure	Professeur 2eme cl	Biologie fonctionnelle
DEMONT	Pierre	Professeur 2eme cl	Santé Publique et Vétérinaire
DESJARDINS PESSON	Isabelle	Maître de conférences Contractuel	Equine
DJELOUADJI	Zorée	Maître de conférences stagiaire	Santé Publique et Vétérinaire
ESCRIOU	Catherine	Maître de conférences cl normale	Pathologie médicale des animaux de compagnie
FAU	Didier	Professeur 1ere cl	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
FOURNEL	Corinne	Professeur 1ere cl	Pathologie morphologique et clinique
FRANCK FRIKHA	Michel Mohamed- Ridha	Professeur 1ere cl Maître de conférences cl normale	Gestion des élevages Pathologie du bétail
GANGL	Monika	Maître de conférences Contractuel	Equine
GARNIER	François	Professeur 1ere cl	Biologie fonctionnelle
GENEVOIS	Jean-Pierre	Professeur cl ex	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
GILOT-FROMONT	Emmanuelle	Professeur 2eme cl	Biologie Fonctionnelle
GONTHIER	Alain	Maître de conférences cl normale	Santé Publique et Vétérinaire
GRAIN	Françoise	Professeur 2eme cl	Gestion des élevages
GRANCHER	Denis	Maître de conférences hors cl	Gestion des élevages
GREZEL	Delphine	Maître de conférences cl normale	Santé Publique et Vétérinaire
GUERIN	Pierre	Professeur 2eme cl	Biotechnologies et pathologie de la reproduction
GUERIN-FAUBLEE	Véronique	Maître de conférences hors cl	Biologie fonctionnelle
HUGONNARD	Marine	Maître de conférences cl normale	Pathologie médicale des animaux de compagnie

NOM	Prénom	Grade	Unité Pédagogique
JUNOT	Stéphane	Maître de conférences cl normale	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
KECK	Gérard	Professeur 1ere cl	Biologie fonctionnelle
KODJO	Angeli	Professeur 2eme cl	Santé Publique et Vétérinaire
LACHERETZ	Antoine	Professeur 1ere cl	Santé Publique et Vétérinaire
LAMBERT	Véronique	Maître de conférences cl normale	Gestion des élevages
LE-GRAND	Dominique	Maître de conférences hors cl	Pathologie du bétail
LEBLOND	Agnes	Professeur 2eme cl	Santé Publique et Vétérinaire
LEFRANC-POHL	Anne-Cécile	Maître de conférences cl normale	Biotechnologies et pathologie de la reproduction
LEPAGE	Olivier	Professeur 1ere cl	Equine
LOUZIER	Vanessa	Maître de conférences cl normale	Biologie Fonctionnelle
MARCHAL	Thierry	Maître de conférences hors cl	Pathologie morphologique et clinique
MIALET Sylvie		Inspecteur de la santé publique vétérinaire (ISPV) faisant fonction de MC	Santé Publique et Vétérinaire
MOUNIER	Luc	Maître de conférences cl normale	Gestion des élevages
PEPIN	Michel	Professeur 1ere cl	Santé Publique et Vétérinaire
PIN	Didier	Maître de conférences cl normale	Pathologie morphologique et clinique
PONCE	Frédérique	Maître de conférences cl normale	Pathologie médicale des animaux de compagnie
PORTIER	Karine	Maître de conférences cl normale	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
PROUILLAC	Caroline	Maître de conférences cl normale	Biologie fonctionnelle
REMY	Denise	Professeur 2eme cl	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
ROGER	Thierry	Professeur 1ere cl	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
SABATIER	Philippe	Professeur 2eme cl	Biologie fonctionnelle
SAWAYA	Serge	Maître de conférences cl normale	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
SERGENTET	Delphine	Maître de conférences cl normale	Santé Publique et Vétérinaire
THIEBAULT	Jean-Jacques	Maître de conférences hors cl	Biologie fonctionnelle
VIGUIER	Eric	Professeur 1ere cl	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
VIRIEUX-WATRELOT	Dorothée	Maître de conférences Contractuel	Pathologie morphologique et clinique
ZENNER	Lionel	Professeur 2eme cl	Santé Publique et Vétérinaire

À Monsieur le Professeur Stéphane Picot,

De la faculté de médecine Lyon Est, Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse, Qu'il trouve ici l'expression de notre gratitude et de nos hommages respectueux.

À Monsieur le Professeur Gilles Bourdoiseau,

De VetAgro Sup, Campus Vétérinaire de Lyon, Pour la confiance qu'il nous a témoignée, Sincères remerciements.

À Monsieur le Professeur Philippe Berny,

De VetAgro Sup, Campus Vétérinaire de Lyon, Pour avoir accepté de prendre part à notre jury de thèse, Sincères remerciements.

À Monsieur le Docteur Jean-Christophe Barale,

De l'Institut Pasteur,
Pour son accueil, son encadrement, et sa disponibilité,
Pour la passion de la recherche qu'il nous a transmise,
Qu'il trouve ici le témoignage de notre profonde gratitude.

À Monsieur le Docteur Hugues Contamin,

De Cynbiose,
Pour la confiance qu'il nous a témoignée,
Pour les projets qu'il nous a confiés,
Qu'il soit ici assuré de notre admiration et de notre fidélité.

À Madame le Docteur Odile Mercereau-Puijalon,

De l'Institut Pasteur,

Pour son accueil au sein de l'Unité d'Immunologie Moléculaire des Parasites.

À Monsieur Olivier Gorgette,

De l'Institut Pasteur,

Pour son encadrement et sa maîtrise de la cytométrie.

À Monsieur Anthony Bouillon,

De l'Institut Pasteur,

Pour son aide précieuse et sa bonne humeur.

À Monsieur Fabrice Taborik,

De Cynbiose,

Pour ses connaissances et son pragmatisme.

À Monsieur Sébastien Mouriot,

De Cynbiose,

Pour son aide précieuse et sa volonté.

À Monsieur le Docteur Thibaud Thiollier,

De Cynbiose,

Pour son accompagnement et son esprit critique.

À tous,

Sincères remerciements.

À mes parents,

Pour leur soutien et les valeurs qu'il m'ont inculquées.

À mes sœurs et frères,

Pour leur présence et la joie qu'ils m'apportent.

À Louise, Alexis et Martin,

Pour être ma raison de construire un monde meilleur.

À Anne-Marie et Frédéric Cormier,

Pour leur hébergement et leur attention durant ce travail.

Au Docteur Jean-Paul Lemonnier,

Pour m'avoir initié au métier de vétérinaire.

À ma grand-mère †,

Pour son amour et son courage.

À mes amis de Caen et de Lyon.

À Claire.

Table des matières

1	Introd	uction au paludisme	. 17
	1.1 Le	cycle biologique de <i>Plasmodium spp.</i>	. 18
	1.2 Ma	anifestations cliniques du paludisme	. 20
	1.3 Ép	oidémiologie	. 20
2	Introd	uction au développement de molécules antipaludiques	. 23
		découverte d'une nouvelle molécule antipaludique	
	2.1.1	Sélection et validation d'une cible	. 25
	2.1.2	Criblage in vitro des antipaludiques potentiels	. 26
		Optimisation des hits en leads	
	2.1.4	Optimisation des leads	. 27
	2.2 Le	développement préclinique	. 27
		Études pharmacodynamiques	
	2.2.2	Études pharmacocinétiques	. 27
	2.2.3	Études toxicologiques	. 28
	2.3 Dé	eveloppement clinique	. 28
3		es animaux pour l'évaluation de l'efficacité de molécules	
	ntipalud	iques <i>in vivo</i>	
		ongeurs et plasmodies murines	
		Test de Peters	
		Test de détermination de la dose	
		Test d'apparition de l'activité et de recrudescence	
		Test prophylactique	
		Test de résistance croisée	
	3.1.6	Avantages et limites des modèles murins	. 32
		ouris humanisées et <i>Plasmodium falciparum</i>	
		Modélisation des stades érythrocytaires	
		Modélisation des stades exo-érythrocytaires	
		Perspectives	
	3.2.4	Avantages et limites du modèle de souris humanisées	. 35
	3.3 Pr	imates non humains et plasmodies simiennes	. 36
		Les modèles primates utilisés lors du développement des molécules	
		aludiques	
		.1.1 Les tests d'efficacité in vivo	
		.1.2 Test d'efficacité centré sur une caractéristique physiopathologique	
		.1.3 Interactions des traitements avec le système immunitaire	. 37
		.1.4 Interactions des traitements antipaludiques avec la physiologie	
	hur	maine	. 38

3.3.1.5 Interactions des traitements antipaludiques avec une infection of	u un
traitement concomitants	38
3.3.2 Limites des modèles primates non humains associés à leurs parasi	tes 38
3.4 Les singes sud-américains et les parasites humains	39
4 Développement d'un modèle d'essai de molécules antipaludiques che	z le
singe écureuil (<i>Saimiri sciureus</i>)	
4.1 Introduction	42
4.2 Matériel et méthodes	
4.2.1 Molécules et produits chimiques	42
4.2.2 Culture de Plasmodium falciparum in vitro	
4.2.3 Infection des souris par Plasmodium berghei	
4.2.4 Infection des singes écureuils par Plasmodium falciparum	
4.2.4.1 Splénectomie	
4.2.4.2 Infection des singes	
4.2.4.3 Évaluation de l'effet antiparasitaire <i>in vivo</i>	
4.2.5 Détermination de la parasitémie	
4.2.5.1 Microscopie optique	
4.2.5.2 Marquage et analyse par cytométrie de flux des échantillons par 47	asités
4.2.6 Évaluation in vitro de la résistance aux molécules antipaludiques	
4.2.7 Tests statistiques	50
4.3 Résultats	50
4.3.1 Évaluation in vitro de la sensibilité aux médicaments	50
4.3.2 Infection de singes écureuils (Saimiri sciureus) par	
Plasmodium falciparum	
4.3.3 Évaluation de la parasitémie par cytométrie de flux	
4.3.3.1 Technique de cytométrie de flux	
4.3.3.1.1 Prélèvements de cultures in vitro de Plasmodium falciparum	
4.3.3.1.2 Prélèvements de souris infectées par Plasmodium berghei	
4.3.3.1.3 Prélèvements de saïmiris infectés par Plasmodium falciparu	
4.3.3.2 Corrélation des techniques de détermination de la parasitémie	
4.3.3.3 Distinction des parasites pycnotiques par la cytométrie de flux	
4.3.4 Évaluation in vivo de l'activité anti-P. falciparum de CD3, un inhibite	
Plasmodium-SUB1	59
4.4 Discussion	61
5 Conclusion	65
6 Bibliographia	67

Liste des annexes

Annexe 1 : Références et fournisseurs des réactifs et produits chimiques	77
Annexe 2 : Composition du milieu RPMI 1640	78
Annexe 3 : Dilutions des molécules pour le test de Desiardins	80

Table des figures

Figure 1 : Cycle biologique de Plasmodium spp. chez l'Homme	19
Figure 2 : Singe écureuil (Saimiri sciureus) mâle de 3 ans	45
Figure 3 : Détermination d'une EC ₅₀ par régression polynômiale	51
Figure 4 : Infection initiale des singes 10 et 11 par P. falciparum suivie	par
microscopie optique et cytométrie de flux	53
Figure 5 : Détermination de la parasitémie par cytométrie de flux	55
Figure 6 : Corrélation des techniques de détermination de la parasitémie	57
Figure 7 : Distinction des formes pycnotiques de Plasmodium falciparum	par
cytométrie de flux	58
Figure 8 : Évaluation in vivo de l'efficacité antipaludique de CD3	60

Table des tableaux

Tableau	$I:EC_{50}$	de sept	molecules	antipaludiques	sur trois	clones	de P.	talcıparum
								51

Table des abréviations

Les abréviations d'unités de mesure utilisées dans cette thèse suivent les recommandations du Système International d'Unités. D'autre part, les abréviations suivantes ont été utilisées :

A.	Anopheles ou Aotus			
ADN	Acide désoxyribonucléique			
Alb	Albumine			
ANKA	Anvers-Kasapa			
AS	Artésunate			
Cl ₂ MDP	Dichlorométhylène biphosphonate			
CQ	Chloroquine			
DDT	Dichlorodiphényltrichloroéthane			
DHA	Dihydrortémisinine			
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline			
EC ₅₀	Efficient Concentration 50%			
ED ₅₀	Efficient Dose 50%			
ED ₉₀	Efficient Dose 90%			
FSC	Forward Scatter			
FUP	Falciparum Uganda Palo Alto			
FVO	Falciparum Vietnam Oak Knoll			
HTS	High Throughput Screening			
IM	Intramusculaire			
IP	Intrapéritonéale			
IV	Intraveineuse			
LU	Luméfantrine			
M.	Macaca			
mAQ	Monodéséthylamodiaquine			
MMV	Medicines for Malaria Venture			
MQ	Méfloquine			
NIH	National Institute of Health			
NK	Natural Killer			
NMRI	Naval Medical Research Institute			
NOD	Non Obese Diabetic			
P.	Plasmodium			
PNH	Primate Non Humain			
PO	Per Os			
QU	Quinine			
RPMI	Roswell Park Memorial Institute			
S.	Saimiri			
SC	Sous-Cutanée			

SCID	Severe Combined Immunodeficiency		
SIDA	Syndrome d'Immunodéficience Acquise		
SIV	Simian Immunodeficiency Virus		
SPF	Specific Pathogen Free		
SSC	Side Scatter		
UF	Unité de Fluorescence		
uPA	Urokinase-type Plasminogen Activator		
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine		

1 Introduction au paludisme

Le paludisme est une maladie parasitaire provoquée par des protozoaires apicomplexés du genre *Plasmodium* appelés plasmodies. Ces parasites sont transmis par la piqûre de moustiques du genre *Anopheles*. Le genre *Plasmodium* compte plus de 200 espèces infectant les reptiles, les oiseaux et les mammifères [81], mais seules cinq d'entre elles infectent de manière sûre les êtres humains. Il s'agit de *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* et *P. knowlesi* [21, 91].

1.1 Le cycle biologique de *Plasmodium spp.*

Ces parasites possèdent des cycles biologiques comparables, faisant intervenir un hôte intermédiaire, l'Homme, et un hôte définitif, le moustique. La Figure 1 illustre le déroulement du cycle de *Plasmodium spp.* [21, 87, 89].

Le parasite, sous forme de sporozoïtes (c'est à dire de forme libre infectante) présent dans les glandes salivaires d'un moustique du genre *Anopheles*, est injecté à l'Homme lors d'un repas sanguin. Les sporozoïtes, migrant par voie sanguine, atteignent le foie où ils pénètrent dans des hépatocytes. C'est le début d'un premier cycle de multiplication asexuée, appelé cycle exo-érythrocytaire. Au sein d'une vacuole, dite parasitophore, le parasite subit alors une série de mitoses et finit par envahir totalement la cellule hôte, formant un schizonte. Grâce à l'action de protéases parasitaires la membrane de la vacuole ainsi que celle de l'hépatocyte se rompent [5]. Des formes unicellulaires sont enfin libérées dans la circulation sanguine : les mérozoïtes.

Ce sont ces formes parasitaires qui vont pénétrer individuellement dans des érythrocytes pour suivre le cycle érythrocytaire de leur développement, seconde phase de multiplication asexuée. Logé dans une vacuole parasitophore, le mérozoïte subit d'abord une phase de croissance au cours de laquelle il passera par un stade dit d'anneau (ou trophozoïte immature) puis un stade de trophozoïte mature. Ce n'est qu'ensuite que débuteront les mitoses successives, à l'origine de l'envahissement total du globule rouge au stade schizonte. À nouveau, des protéases provoquent une déstabilisation du cytosquelette et de la membrane cellulaire et déclenchent la libération de mérozoïtes dans la circulation sanguine [5]. Ce cycle érythrocytaire se répète plusieurs fois de suite, ce qui aboutit à une augmentation par paliers de la parasitémie, puisque la rupture de tous les schizontes arrivés à maturité est synchrone.

Au bout d'un certain nombre de cycles, et sous la pression de la réponse immunitaire, certains trophozoïtes prennent une orientation différente et engagent la phase de reproduction sexuée. Ils se différencient en gamétocytes qui deviennent mâle ou femelle. Ingérés par une femelle *Anopheles* lors d'un repas sanguin, ils gagnent le tube digestif du moustique et deviennent gamètes. La fécondation a alors lieu, aboutissant à un ookynète.

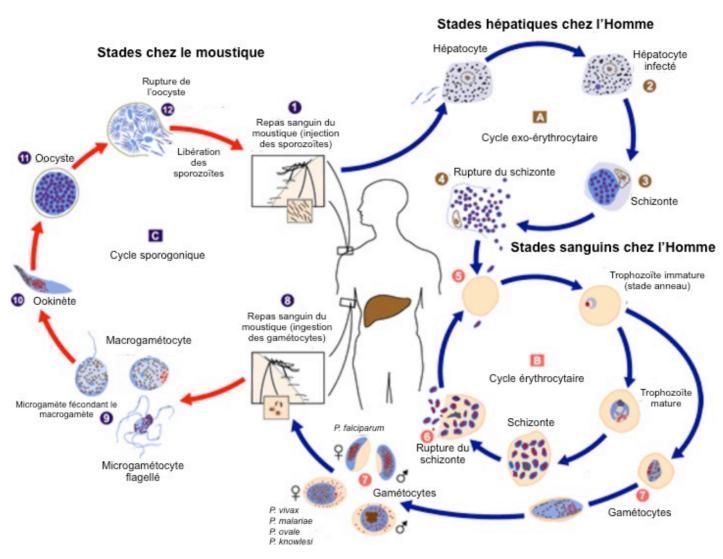


Figure 1 : Cycle biologique de Plasmodium spp. chez l'Homme (adapté du Center for Disease Control and Prevention [8])

Celui-ci migre à travers la paroi du tube digestif jusqu'à sa face externe où il s'implante et devient oocyste. Une série de mitose a alors lieu, jusqu'à la libération de nouveaux sporozoïtes. Ceux-ci gagnent les glandes salivaires et y attendent un nouveau repas sanguin pour infecter un nouvel Homme.

1.2 Manifestations cliniques du paludisme

La majorité des cas de paludisme est représentée par les accès palustres simples. Ceux-ci se manifestent par une fièvre souvent récurrente apparaissant au moment de la libération des mérozoïtes dans la circulation sanguine. Celle-ci s'accompagne en effet du relargage de nombreuses molécules pro-inflammatoires [12].

Les formes de paludisme sévère ou compliqué apparaissent en général chez des individus non immuns. L'organisation Mondiale de la Santé classifie comme paludisme sévère les formes associant à la présence de parasites dans le sang un ou plusieurs des symptômes suivants [87] :

- Coma (dans les cas de paludisme cérébral);
- Détresse respiratoire, œdème pulmonaire ;
- Hypoglycémie;
- · Anémie sévère ;
- Crises convulsives généralisées et répétées ;
- · Acidose métabolique ;
- État de choc.

Le déterminisme de l'apparition ou non de ces formes est inconnu et résulte probablement de l'association de caractéristiques de l'hôte et du parasite [12]. Ces formes peuvent être combinées et peuvent soit apparaître spontanément, soit après une fièvre simple.

1.3 Épidémiologie

Cinq espèces de plasmodies infectent les êtres humains, mais *P. falciparum* est le principal responsable de la mortalité et de la morbidité due au paludisme [27]. Le Programme Mondial d'Éradication du Paludisme, adopté par l'Organisation Mondiale de la Santé en 1955, a permis de débarrasser les pays développés de ce fléau, mais la maladie est restée endémique dans une grande partie de l'Afrique sub-saharienne, de l'Amérique latine, de l'Asie et du Moyen-Orient [95]. Cette éradication partielle a été permise par l'utilisation conjointe de moyens de contrôle des vecteurs (principalement des insecticides, au premier rang desquels le DDT), et de lutte contre les cas de paludisme à l'aide de molécules telles que la quinine et la chloroquine [65].

En 2009, selon les estimations de l'Organisation Mondiale de la Santé, l'incidence du paludisme a atteint 225 millions de cas, parmi lesquels 781 000 personnes, dont 85% d'enfants de moins de cinq ans, mourraient de la maladie, principalement en Afrique Noire [29]. D'autre part, la résistance du parasite à de multiples molécules s'est répandue à travers le monde et menace le traitement et le contrôle de la maladie. Plus inquiétant encore, des échecs de traitement par les dérivés de l'artémisinine, la classe la plus récente de molécules antipaludiques, ont déjà été rapportés [18, 41, 68].

2 Introduction au développement de molécules antipaludiques

En l'absence d'un vaccin efficace, les molécules antipaludiques sont le moyen le plus efficace de lutter contre la mortalité et la morbidité dues aux plasmodies humaines. Face à la situation de résistance des parasites aux médicaments antipaludiques, il apparaît très urgent de développer de nouvelles molécules. Pour être utilisables en zone d'endémie, celles-ci doivent répondre à plusieurs caractéristiques [23] :

- Avoir une efficacité rapide, même contre des souches résistantes ;
- Être utilisables chez l'enfant et la femme enceinte ;
- Avoir une formulation orale;
- Être disponibles à bon marché.

C'est dans ce but que *Medicines for Malaria Venture* (MMV), une association à but non lucratif, rassemble des partenaires publics, privés et des mécènes pour financer et coordonner la découverte de nouvelles molécules antipaludiques. Actuellement, MMV recense plus de 20 candidats antipaludiques en cours de développement [59].

La première génération de molécules antipaludiques a été inspirée par la pharmacopée traditionnelle. La quinine était extraite de l'écorce du quinquina (*Cinchona officinalis*), arbre d'Amérique du Sud connu pour soigner la « fièvre tierce » [105]. De même, l'artémisinine contenue dans l'armoise annuelle (*Artemisia annua*) était connue comme antipaludique depuis plus de 2000 ans par les Chinois [105].

Puis des dérivés chimiques de ces molécules furent synthétisés artificiellement et utilisés à grande échelle. La chloroquine, dérivée de la quinine, fut la molécule qui permit l'éradication du paludisme dans de nombreux pays dans les années 1950. Aujourd'hui, les dérivés de l'artémisinine, tels que l'artésunate, l'artéméther ou l'artééther entrent dans la composition de la plupart des médicaments antipaludiques distribués de par le monde.

Dernièrement, les progrès technologiques et la maîtrise de la culture des plasmodies, *in vivo* chez la souris et *in vitro* sur hématies humaines ont permis une automatisation du processus de test des molécules. Ceci a permis de s'affranchir des molécules existantes pour explorer les propriétés antipaludiques de nombreuses autres familles chimiques. La découverte de nouvelles molécules à activité antipaludique fait aujourd'hui appel aux techniques de criblage à haut débit (ou *HTS* pour *High Throughput Screening*) et de conception moléculaire rationnelle (ou *rational drug design*) [23].

2.1 La découverte d'une nouvelle molécule antipaludique

Cette section détaille le processus qui permet la découverte et la validation d'une nouvelle molécule active contre les plasmodies. Il existe plusieurs manières d'aborder une banque de composés chimiques à tester.

Il est possible de tester l'effet antipaludique de molécules sur des cultures de parasites grâce au développement par Trager et Jensen [94] de la culture de *P. falciparum* sur globules rouges humains *in vitro*. Cette approche permet de tester l'effet des molécules sur l'ensemble du métabolisme du parasite, sans préjuger de sa cible moléculaire.

L'approche inverse consiste à identifier au préalable une cible moléculaire, de manière à s'intéresser uniquement à l'effet des molécules sur cette cible. Ceci permet d'accélérer le processus de développement. L'étape d'identification et de validation d'une cible moléculaire est développée dans le paragraphe suivant, et ne concerne que cette deuxième approche.

2.1.1 Sélection et validation d'une cible

Le processus débute par la sélection d'une cible thérapeutique. Celle-ci peut être un processus métabolique, voire une enzyme particulière, vital chez le parasite et dont l'inhibition lui sera fatale. Elle peut être identifiée de plusieurs manières :

- Il peut s'agir d'une cible présente à la fois chez l'hôte et le parasite. Celle-ci ne sera exploitable que si elle présente des différences structurelles entre les deux espèces. Si l'équivalent humain de cette cible a déjà été étudié, et est éventuellement déjà une cible thérapeutique pour d'autres indications, le processus de développement d'une molécule antipaludique bénéficiera de ce travail préalable et son coût en sera diminué. Par exemple, la recherche effectuée sur les cystéine-protéases humaines dans le cadre de la lutte contre l'ostéoporose [83] a permis de considérer les cystéine-protéases des parasites du genre *Plasmodium* comme des cibles intéressantes [82].
- Une cible peut aussi avoir été identifiée auparavant chez d'autres microorganismes, contre lesquels des inhibiteurs ont déjà été synthétisés, et peuvent servir de base au processus de criblage. Il en est ainsi d'antibiotiques tels que les tétracyclines et la clindamycine qui se trouvent avoir une activité antipaludique dirigée sur les apicoplastes du parasite, organites dérivés d'une endosymbiose bactérienne [80]. De même, les inhibiteurs des protéases du virus de l'immunodéficience humaine (VIH), déjà utilisés comme traitements antirétroviraux, ont montré une activité antipaludique in vitro [73] puis in vivo dans des modèles rongeur et primate [35, 55].
- L'identification des cibles des antipaludiques historiques permet également de définir des cibles intéressantes. Ainsi, la découverte que la chloroquine empêche la détoxification de l'hème par le parasite en interagissant avec la production de l'hæmozoïne, ou pigment malarique, a permis de considérer ce processus métabolique comme une cible intéressante [4].

Une fois la cible sélectionnée, elle ne sera utilisable qu'après avoir été validée. Deux méthodes permettent la validation d'une cible potentielle [23]. Elles consistent à s'assurer que l'inhibition de cette cible a bien un effet antipaludique.

La première méthode utilise un ou plusieurs inhibiteurs déjà connus de la cible à évaluer. Une cible sera alors validée par la démonstration que ces inhibiteurs ont un effet antipaludique, si possible fort.

La deuxième méthode consiste à invalider le gène codant pour la cible dans un parasite transgénique. Si le développement du parasite est inhibé, cela signifie que la cible a pour lui un rôle vital. Elle est donc intéressante.

2.1.2 Criblage in vitro des antipaludiques potentiels

Cette étape consiste à évaluer l'activité antipaludique d'une grande quantité de molécules grâce à des tests automatisés : on parle de criblage à haut débit. Si une cible moléculaire a été identifiée et validée, un test enzymatique est mis au point, afin d'évaluer l'inhibition de l'activité enzymatique de la cible par les composés criblés. Si aucune cible n'a été identifiée, le criblage peut s'effectuer sur des cultures de parasites, grâce au test de Desjardins [17] décrit au paragraphe 4.2.6.

Les composés montrant un effet intéressant au cours de ce criblage sont appelés *pre-hits*. La phase suivante est la validation de ces *pre-hits* par différents tests *in vitro*. On peut pour cela évaluer l'activité de ces composés sur des cultures de différentes souches de *P. falciparum*, y compris des souches résistantes à différents antipaludiques existants. On réalise également des études dose-réponse afin de quantifier le pouvoir antipaludique des composés.

Les composés finalement les plus intéressants, ayant un spectre d'activité large et une forte activité antipaludique, sont appelés *hits* validés.

2.1.3 Optimisation des hits en leads

Les composés retenus jusqu'ici subissent ensuite des transformations visant à augmenter leur pouvoir antipaludique et leur spécificité pour la cible moléculaire. Des dérivés chimiques de ces composés sont synthétisés, soit empiriquement, soit après conception assistée par ordinateur lorsque la structure tridimensionnelle de la cible moléculaire est connue. On peut ainsi concevoir des inhibiteurs ayant par exemple une meilleure complémentarité stérique avec leur cible que les *hits* originaux.

Les composés ainsi synthétisés sont testés et évalués sur des cultures in vitro, et les plus actifs et les plus spécifiques sont sélectionnés.

C'est aussi à ce moment du développement qu'ont lieu les premiers essais *in vivo*. Ceux-ci permettent d'évaluer l'efficacité des composés synthétisés chez des modèles animaux, donc dans des conditions plus proches du traitement humain. Les modalités de ces essais *in vivo* seront présentées dans les paragraphes suivants.

Le ou les composés les plus actifs *in vivo* et ayant le moins d'effets toxiques deviennent alors des *leads*. Le nombre de *leads* est à ce stade très réduit. Il peut alors ne subsister qu'une molécule intéressante parmi les dizaines de milliers criblées dans les premiers temps.

2.1.4 Optimisation des leads

La dernière phase de la découverte d'une nouvelle molécule antipaludique vise à améliorer les caractéristiques d'un *lead* qui en font un bon candidat médicament. La synthèse de nouveaux dérivés chimiques à partir des composés les plus actifs sélectionnés permet par exemple d'augmenter la biodisponibilité, la solubilité ou de diminuer la toxicité [23].

Là encore, les essais font appel à des modèles animaux, seuls permettant d'évaluer par exemple la pharmacocinétique des molécules testées.

2.2 Le développement préclinique

Le développement préclinique des médicaments est une phase exigée par la réglementation internationale, durant laquelle doivent être démontrées l'innocuité et l'efficacité d'un candidat médicament sur des modèles cellulaires et animaux [51]. Les études menées durant cette phase sont apportées au dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché (AMM), elles doivent donc être menées selon des normes de qualité scientifique strictes édictées par le référentiel des Bonnes Pratiques de Laboratoire. Ces études seront analysées de près lors de la demande d'AMM auprès des autorités de santé.

2.2.1 Études pharmacodynamiques

Ces études ont pour but de valider le mécanisme d'action du médicament et de mesurer son activité dans des modèles expérimentaux de l'infection. On doit donc ici aussi utiliser des modèles animaux d'infection par le paludisme.

2.2.2 Études pharmacocinétiques

Ces études visent à décrire et modéliser l'évolution du composé administré dans l'organisme lors de son absorption, de sa distribution, de sa métabolisation et de son élimination.

2.2.3 Études toxicologiques

Ces études permettent de déterminer les effets indésirables du médicament chez des modèles animaux. Elles ont pour but de connaître les organes cibles de la molécule et les doses toxiques. Ces études doivent être menées chez plusieurs espèces animales, dont un rongeur et une autre espèce mammalienne.

2.3 Développement clinique

Il s'agit de la phase d'essai chez l'Homme des candidats médicaments. Cette phase ne peut commencer qu'une fois que les essais sur les animaux ont permis de s'assurer de l'innocuité de la molécule et de déterminer la meilleure forme galénique et la dose adéquate. Ils se déroulent en plusieurs phases et consistent en des tests de tolérance et d'efficacité. Cette phase du développement d'un médicament ne sera plus abordée ici.

3 Modèles animaux pour l'évaluation de l'efficacité de molécules antipaludiques *in vivo*

Au vu de la partie précédente, il apparaît absolument nécessaire de disposer de modèles *in vivo* pertinents pour la recherche de nouveaux traitements antipaludiques. Cependant, les rongeurs, qui sont les mammifères les plus utilisés dans la recherche biomédicale, ne peuvent pas être naturellement infectés par les plasmodies humaines [23]. Cette difficulté a été contournée de plusieurs manières, et deux catégories de modèles sont aujourd'hui utilisées :

- Les modèles exploitant l'infection naturelle d'animaux par leurs plasmodies spécifiques, celle-ci mimant le paludisme humain de manière plus ou moins fidèle;
- Les modèles reposant sur l'infection forcée d'un animal par une plasmodie humaine, par le biais d'adaptations de l'hôte ou du parasite.

Les espèces animales utilisées sont des rongeurs ou des primates non humains (PNH). Cette partie propose une revue bibliographique des modèles animaux de paludisme utilisés dans le processus de développement de molécules antipaludiques.

3.1 Rongeurs et plasmodies murines

Face à la difficulté et au coût important de l'utilisation de PNH dans les phases précoces du développement des médicaments antipaludiques, les modèles les plus utilisés pour la sélection et l'optimisation des *leads* ont longtemps été, et restent encore, des modèles rongeurs. Il s'agit de l'infection de souris par des espèces de *Plasmodium* spécifiques des rongeurs. Les espèces les plus utilisées dans ce domaine sont *Plasmodium berghei*, *Plasmodium yoelii*, *Plasmodium chabaudi* et *Plasmodium vinckei* [86].

Les paragraphes suivants détaillent les différents essais qui peuvent être menés lors des phases précoces du développement d'un médicament. L'espèce la plus utilisée lors de ces essais est *Plasmodium berghei* [23].

3.1.1 Test de Peters

Le test le plus communément utilisé pour évaluer l'effet antipaludique d'une molécule in vivo est appelé « test suppressif de 4 jours » ou test de Peters [74]. Celui-ci permet d'évaluer l'efficacité de quatre doses quotidiennes de la molécule à tester en comparant la parasitémie au quatrième jour post-infection et la mortalité entre des souris infectées traitées ou non traitées.

Dans les conditions standard du test, la souche parasitaire utilisée est la souche ANKA (Anvers-Kasapa) de *P. berghei* [102]. Les souris sont des femelles indemnes

de pathogènes spécifiques (ou SPF pour *Specific Pathogen Free*) de la lignée Swiss ou NMRI (*Naval Medical Research Institute*), de 25 ± 2 g. Elles doivent être indemnes d'*Eperythrozoon coccoides* et de *Haemobartonella muris* car ces pathogènes sanguins interfèrent avec le développement de *P. berghei* [36, 71].

Le protocole expérimental est le suivant :

- Jour 0: du sang parasité est prélevé sur une souris donneuse avec une seringue héparinée (la parasitémie, c'est à dire la proportion des hématies circulantes étant parasitées, doit être d'environ 30%). Il est dilué dans du sérum physiologique jusqu'à 10⁸ globules rouges parasités par millilitre. 0,2 mL de cette solution est injecté par voie intrapéritonéale (IP) aux souris naïves réparties par groupes de 5.
- Deux à quatre heures après l'infection, le groupe test reçoit une dose de la molécule à tester (de 30 ou 50 mg/kg en général) par voie IP ou sous-cutanée (SC). Le groupe témoin reçoit par la même voie la même quantité du véhicule dans lequel la molécule a été diluée pour le groupe test;
- **Jours 1 à 3 :** toutes les souris reçoivent chaque jour le même traitement qu'au jour 0, à la même dose et par la même voie ;
- Jour 4: 24 heures après le dernier traitement, soit 96 heures après l'infection, un frottis sanguin est coloré pour chaque animal et la parasitémie est déterminée. L'activité de la molécule est déterminée en comparant le groupe témoin au groupe traité;
- Les souris non traitées meurent en général une semaine après l'infection. Le temps de survie des animaux traités est enregistré et sa moyenne est comparée à celle des animaux témoins. Les souris ne présentant pas de parasitémie au trentième jour post-infection sont considérées comme guéries.

Une comparaison peut également être établie avec un témoin positif, c'est à dire une molécule connue pour inhiber le développement parasitaire, telle que la chloroquine ou l'artémisinine.

3.1.2 Test de détermination de la dose

Ce test permet de déterminer la dose de molécule adéquate à administrer. Le protocole est le même que celui du test de Peters décrit ci-dessus, excepté que la molécule étudiée est administrée au minimum à quatre doses différentes (en général à 100, 30, 10 et 3 mg/kg) avec un témoin négatif, et par deux voies d'administration (en général SC et *per os* (PO)).

Ce test permet de déterminer les ED_{50} (*Efficient Dose 50%*) et ED_{90} (*Efficient Dose 90%*) de la molécule, c'est à dire les doses pour lesquelles on obtient respectivement 50 et 90% de réduction de la parasitémie [23].

Il permet également d'estimer la biodisponibilité orale, par comparaison avec la voie d'administration parentérale.

3.1.3 Test d'apparition de l'activité et de recrudescence

Dans ce test, une unique dose de molécule à 100 mg/kg est administrée au jour 3 post-infection par voie SC. Des souris témoins ne reçoivent que le véhicule. Des frottis sanguins sont réalisés 12 heures puis 24 heures après le traitement, puis quotidiennement jusqu'au jour 33.

Ce test permet d'appréhender la vitesse d'apparition de l'activité de la molécule, le délai avant recrudescence de l'infection ou encore le temps de survie des animaux.

3.1.4 Test prophylactique

Ce test consiste à administrer 100 mg/kg de la molécule à tester 72 heures, 48 heures puis 24 heures avant le moment de l'infection. Des frottis réguliers sont ensuite réalisés pour évaluer la parasitémie. Le temps de survie en jours est également analysé.

3.1.5 Test de résistance croisée

Ce test est particulièrement intéressant pour l'évaluation des molécules dérivées de médicaments existants ou agissants sur la même cible, puisqu'une lignée parasitaire résistante à un médicament peut l'être aussi aux molécules proches dans leur structure ou leur mode d'action.

Le test consiste à renouveler le test de Peters avec des lignées de parasites de rongeurs résistantes aux médicaments actuels, et à en comparer les résultats avec ceux de la lignée parasitaire sensible (par exemple *P. berghei* ANKA).

3.1.6 Avantages et limites des modèles murins

Le principal avantage de ces modèles réside dans leur faible coût et leur facilité de mise en œuvre. De ce fait, ils sont utilisables à grande échelle pour un criblage durant les stades précoces du développement des molécules antipaludiques. En pratique, ces modèles sont utilisés dès la validation des *hits* durant la phase d'optimisation chimique.

Les parasites de rongeurs sont cependant éloignés phylogénétiquement des parasites humains [81]. La parenté des cibles moléculaires est donc lointaine et un effet observé chez ces espèces n'est pas forcément reproductible sur des parasites humains.

Il est donc très important dans la pratique de réaliser des essais sur des modèles animaux plus proches de l'infection humaine. En effet, les modèles murins

décrits ci-dessus introduisent deux paramètres très différents de la situation humaine : l'hôte, c'est à dire la souris, et le parasite. Les modèles décrits ensuite tentent de pallier ce problème en utilisant des parasites bien plus proches des parasites humains, voire les parasites humains eux-mêmes.

3.2 Souris humanisées et *Plasmodium falciparum*

Face à l'impossibilité d'infecter naturellement des rongeurs avec des parasites infectant l'Homme et au coût important des modèles primates non humains, un nouveau modèle a été développé depuis une dizaine d'années. Il s'agit de souris chimères auxquelles sont greffées des cellules humaines pour permettre le développement de *P. falciparum*.

3.2.1 Modélisation des stades érythrocytaires

L'infection de souris par les formes sanguines des plasmodies humaines nécessite le remplacement des érythrocytes murins par des érythrocytes d'origine humaine. Ceci a été rendu possible par l'utilisation de souris présentant une immunodéficience combinée sévère (ou souris SCID pour Severe Combined Immunodeficiency) dès 1994 [40]. Ces souris présentent un déficit d'activité des lymphocytes T et B. Les premières infections par des stades sanguins de *P. falciparum* ont eu un succès limité [99]. Ce n'est qu'en combinant l'utilisation de souris immunodéficientes et de molécules ciblant les phagocytes que des progrès significatifs furent faits [3]. En 1995, Badell *et al.* procédèrent à l'injection intrapéritonéale de dichlorométhylène biphosphonate (Cl₂MDP) encapsulé dans des liposomes, permettant d'inhiber les macrophages, ainsi que d'anticorps monoclonaux NIMP-R14 ciblant les polynucléaires neutrophiles. Le taux de succès de l'infection devint alors intéressant mais les parasitémies obtenues étaient faibles (en moyenne de 0,1%). Ils utilisèrent également une autre lignée de souris : la lignée NIH III présentant les mutations suivantes :

- Beige (bg): affectant la maturation des cellules Natural Killer (NK) et la motilité des macrophages;
- X-linked Immune Defect (xid): affectant la maturation des lymphocytes B indépendants des cellules T;
- Nude (nu): provoguant une absence de lymphocytes T.

Ce modèle fut utilisé par Moreno *et al.* en 2001 [61] pour évaluer la pertinence des souris humanisées pour l'essai de molécules antipaludiques. Il fût montré que le profil de résistance de souches connues chez l'Homme était conservé dans ce modèle, et que les effets des médicaments sur la morphologie des parasites étaient identiques.

Un modèle similaire, utilisant cette fois des souris NOD (*Non Obese Diabetic*)/SCID et les mêmes molécules immunomodulatrices, a commencé à être utilisé par l'industrie pharmaceutique en 2008 pour évaluer l'efficacité antipaludique de la trioxaquine, une molécule synthétique inspirée du mode d'action de l'artémisinine [15].

Le modèle fut amélioré en 2009 par Jiménez-Díaz *et al.* [42] par l'utilisation de souris NOD/SCID présentant une mutation de la chaine γ du récepteur de l'interleukine 2 (IL2R), appelées souris NSG (pour NOD, SCID et IL2R γ -null). Ce profil génétique diminue l'inflammation due à *P. falciparum* et permet de se passer des molécules immunomodulatrices précédemment utilisées. À son tour, ce modèle fut utilisé dès 2011 par l'industrie pour tester des inhibiteurs de la dihydroorotate déshydrogénase de *P. falciparum* (enzyme intervenant dans la biosynthèse de la pyrimidine) [16].

Les tests réalisables sur ces modèles de souris chimères sont les mêmes que sur les modèles exposés au paragraphe 3.1.

3.2.2 Modélisation des stades exo-érythrocytaires

La première expérience de développement des stades exo-érythrocytaires de *P. falciparum* chez des souris chimères fut réalisée en 1992 par Sacci *et al.* [85]. Elle utilisait des souris SCID de la souche CB-17 auxquelles étaient greffés sous la capsule rénale des hépatocytes humains prélevés lors de chirurgies hépatiques. Des sporozoïtes de la souche NF54 de *P. falciparum* étaient ensuite injectés par voie intraveineuse, et les animaux étaient sacrifiés au fur et à mesure pour suivre le développement des formes hépatiques. Sur les 34 souris greffées et infectés, Sacci *et al.* rapportèrent un taux de succès de l'infection de 100%.

Dans les années qui suivirent, d'autres laboratoires tentèrent de renouveler l'expérience sans succès, ce qui suscita de forts doutes quant à la pertinence de ce modèle [2].

Le développement ultérieur de souris SCID possédant à l'état homozygote ou hétérozygote un transgène associant au promoteur de l'albumine le gène de l'activateur du plasminogène de type urokinase (ou souris SCID/Alb-uPA) a relancé le développement de chimères portant des hépatocytes humains. L'expression par les hépatocytes murins de l'activateur du plasminogène leur est en effet fatale, et ceux-ci disparaissent rapidement du foie, permettant une colonisation non contrariée de l'organe par les hépatocytes humains greffés [60].

En 2006, l'infection de ces souris transgéniques par des sporozoïtes de P. falciparum fut retentée avec succès par deux équipes différentes. Sacci et al. [84] infectèrent des souris SCID/Alb-uPA homozygotes avec des sporozoïtes de la souche NF54. Morosan et al. [64] utilisèrent des souris SCID hétérozygotes pour le transgène Alb-uPA. Ils réduisirent également les défenses immunitaires innées par l'utilisation de Cl_2MDP encapsulé dans des liposomes, réduisant le nombre de macrophages tissulaires et circulants, et d'un anticorps monoclonal anti-thrombomoduline $\beta1$, ciblant les cellules NK.

Aucune étude n'a pour l'instant rapporté d'essai de molécules antipaludiques contre les stades hépatiques des parasites humains dans un de ces modèles.

3.2.3 Perspectives

Au vu des progrès rapides réalisés chez ces deux types de chimères dans les dix dernières années, il est envisageable de procéder d'ici peu de temps à la réalisation d'un cycle complet de *P. falciparum* chez la souris. Il faudra d'abord parvenir à greffer à la fois à des rongeurs des hépatocytes et des érythrocytes humains.

L'adaptation de cette méthode de culture aux autres espèces de plasmodies humaines paraît pour l'instant difficilement réalisable étant données les caractéristiques biologiques de ces parasites.

3.2.4 Avantages et limites du modèle de souris humanisées

Puisque ce modèle repose sur la multiplication parasitaire dans des cellules d'origine humaine, et que la différence d'environnement hématologique n'est pas un obstacle à la croissance des plasmodies [63], il ne nécessite pas d'adapter les souches de *P. falciparum* avant d'obtenir une infection répétable. Moreno *et al.* [62] ont montré cette possibilité en cultivant *in vivo* différentes souches de laboratoire ainsi que plusieurs isolats de terrain sans adaptation préalable, et en observant la plupart des symptômes d'une infection humaine ainsi que le développement de formes sexuées.

D'autre part, l'utilisation de souris, même à grande échelle, rencontre beaucoup moins de contraintes que celle de primates aux niveaux éthique, économique et pratique.

L'un des premiers problèmes de ces modèles est l'utilisation de drogues pour contrôler l'immunité résiduelle. En effet, des interactions médicamenteuses sont possibles, en particulier lors de la métabolisation, et peuvent remettre en cause la validité des résultats.

D'autre part, ces souris nécessitent des soins fréquents et particuliers, car elles ont besoin d'injections régulières d'érythrocytes humains et de molécules immunomodulatrices pour maintenir une parasitémie. Elles peuvent donc être particulièrement couteuses en comparaison aux souris classiques.

Enfin, la nature même de ces souris fait qu'il est impossible de tester chez elles des molécules dont l'effet s'appuie sur des caractéristiques humaines autres que la sensibilité à *P. falciparum*. Par exemple, un des axes de recherche de molécules antipaludiques ne s'intéresse pas au parasite lui-même, mais à la stimulation du système immunitaire [33, 44, 49, 92, 103]. Ces souris étant dans tous

les cas fortement immunodéprimées, elles ne constituent alors pas un modèle intéressant. D'autres types de molécules ciblent la capacité d'adhésion des érythrocytes parasités à la surface endothéliale des vaisseaux sanguins, en particulier au niveau capillaire, phénomène suspecté d'être à l'origine de forme sévères de paludisme [12]. Or les modèles de stades érythrocytaires ne montrent pas de séquestration marquée des érythrocytes parasités dans les vaisseaux sanguins des souris [63], ce qui est possiblement dû à des différences entre les molécules d'adhésion intercellulaires humaines et murines.

3.3 Primates non humains et plasmodies simiennes

Les PNH infectés par leurs plasmodies naturelles constituent une alternative intéressante pour les études in vivo. La proximité phylogénétique entre l'Homme et les PNH assure la pertinence de ces modèles en ce qui concerne les voies métaboliques et la pharmacocinétique, mais aussi les éventuels effets secondaires. De plus, différentes espèces de PNH sont infectées par différentes espèces de Plasmodium qui reproduisent avec précision la diversité des espèces infectant l'homme et les caractéristiques physiopathologiques de leur infection [10, 11]. L'association du chimpanzé et de P. reichenowi constitue le modèle le plus proche phylogénétiquement de l'infection de l'Homme par P. falciparum [81], mais son utilisation est interdite aujourd'hui. L'association du macaque (Macaca mulatta) avec P. cynomolgi est un modèle pertinent de l'infection humaine par P. vivax [10], et est régulièrement utilisé pour évaluer des molécules en développement [14, 45, 58].

3.3.1 Les modèles primates utilisés lors du développement des molécules antipaludiques

Le PNH le plus utilisé pour l'étude des molécules antipaludiques est le macaque rhésus. Cela tient à la fois à sa bonne disponibilité pour les laboratoires et à la facilité à obtenir une infection standardisée avec plusieurs espèces et souches de parasites. En effet, de nombreuses espèces de *Plasmodium* ont pour hôtes naturels des cercopithécidés (ou singes de l'ancien monde), dont *M. mulatta* [106]. Il en résulte qu'il a été possible de déterminer précisément le profil d'infection, de parasitémie, de relargage et de recrudescence pour plusieurs espèces infectant le macaque rhésus, telles que *P. cynomolgi*, *P. coatneyi* et *P. knowlesi* [10].

La variété des espèces et des souches disponibles infectant le macaque rhésus permet également de reproduire fidèlement les différents types d'infection apparaissant chez l'Homme [106]. Par exemple, *P. cynomolgi* mime une infection par *P. vivax* de par ses caractéristiques biologiques, *P. coatneyi* est proche de *P. falciparum* et *P. simiovale* correspond à *P. ovale* chez l'Homme [10].

3.3.1.1 Les tests d'efficacité in vivo

Les tests d'efficacité chez les primates n'ont pas été standardisés comme ils ont pu l'être chez la souris. Cependant, les protocoles sont la plupart du temps inspirés des modèles rongeurs et adaptés aux spécificités des primates et de la molécule à tester.

Le macaque rhésus est la seule espèce de primate à avoir été utilisée dans de tels essais. Il est généralement associé à *P. cynomolgi* [14, 20, 45, 77-79]. *P. knowlesi* est également utilisé [90].

Les essais peuvent avoir pour but de déterminer l'efficacité curative de la molécule testée [45, 77], ou bien l'efficacité prophylactique lorsqu'elle est administrée avant l'infection [20, 78].

Le test peut être mené sur les phases sanguines lorsque l'infection se fait par injection intraveineuse de globules rouges parasités [45, 78], ou bien sur les sporozoïtes et les phases hépatiques lorsque l'infection est initiée par inoculation de sporozoïtes extraits de glandes salivaires de moustiques [14].

3.3.1.2 Test d'efficacité centré sur une caractéristique physiopathologique

Certaines molécules antipaludiques en cours de développement ciblent un mécanisme physiopathologique particulier du développement parasitaire lors d'accès palustre. Or la variété des modèles primates d'infection par une espèce de *Plasmodium*, qu'elle soit d'origine humaine ou simienne, fait qu'il existe souvent plusieurs modèles reproduisant ce mécanisme et s'approchant des cas humains [10].

Par exemple, la capacité de *P. falciparum* à provoquer des cas de paludisme cérébral, se caractérisant par des atteintes nerveuses, est reproduite fidèlement en infectant des macaques rhésus par *P. fragile* [26] ou *P. coatneyi* [1]. En effet, ces deux espèces présentent une adhérence des schizontes à la surface endothéliale des capillaires cérébraux identique à celle de *P. falciparum* [96]. Il est possible grâce à ces modèles de tester la capacité de molécules à réduire l'incidence de cas graves de paludisme comme lors de paludisme cérébral [57, 96].

3.3.1.3 Interactions des traitements avec le système immunitaire

L'un des principaux intérêts des modèles primates en recherche biomédicale est la proximité de leur système immunitaire avec celui de l'Homme [38, 52, 72, 75, 93]. De ce fait, ils sont un modèle particulièrement précieux pour le développement des vaccins [25, 37] ou l'étude des infections du système immunitaire telles que le SIDA (Syndrome d'Immunodéficience Acquise) [97].

Cette caractéristique est aussi utile dans le cadre du développement des molécules antipaludiques. Les molécules nouvelles peuvent en effet avoir un effet délétère sur le système immunitaire. Dans le cadre du développement médicamenteux, il est important de s'assurer que ces molécules ne compromettent pas l'action antipaludique du système immunitaire [70, 76, 88].

À l'inverse, il est aussi possible aussi de s'assurer qu'une réaction immunitaire à l'encontre de la molécule testée ne compromet pas son activité antipaludique [104].

3.3.1.4 Interactions des traitements antipaludiques avec la physiologie humaine

Les modèles PNH présentent un intérêt dans plusieurs domaines de la santé humaine du fait de leur proximité phylogénétique avec l'Homme.

Par exemple, la similarité du cycle sexuel chez les guenons et la femme permet l'étude des interactions entre hormones sexuelles, infection par *Plasmodium spp.* et molécules contraceptives et antipaludiques [19].

3.3.1.5 Interactions des traitements antipaludiques avec une infection ou un traitement concomitants

Les pays les plus touchés par le paludisme sont aussi atteints par d'autres grandes maladies telles que le SIDA ou la tuberculose. Il est donc très probable qu'un patient traité pour un accès palustre en zone d'endémie soit également porteur du VIH ou de mycobactéries tuberculeuses, et reçoive éventuellement un autre traitement pour ces infections. Or il a été montré que de nombreuses interactions sont possibles entre un traitement antipaludique et une infection ou un traitement concomitants chez l'Homme [24, 48]. Par exemple, il existe une synergie entre la chloroquine et les antirétroviraux ritonavir et indinavir, qui a pour conséquence une augmentation de l'efficacité du traitement antipaludique [34, 54]. Mais ces interactions ne sont pas toujours bénéfiques.

En conséquence, il est primordial de vérifier qu'une molécule antipaludique en développement ne présente pas de telles interactions, qui compromettraient sa mise à disposition dans les pays d'endémie. Pour ce faire, il est possible de co-infecter des macaques rhésus avec le virus de l'immunodéficience simienne (SIV), qui est un modèle expérimental classique de l'infection par le VIH, et une plasmodie simienne, telle que *P. cynomolgi* [46] ou *P. fragile* [98].

3.3.2 Limites des modèles primates non humains associés à leurs parasites

Les modèles décrits ci-dessus sont relativement proches, aussi bien au niveau phylogénétique que pathologique, des infections humaines. Mais ils n'en utilisent pas moins des parasites qui, hormis *Plasmodium knowlesi*, n'infectent pas l'Homme.

D'autre part, si les primates couramment utilisés, c'est à dire les macaques, constituent l'un des modèles les plus fiables aujourd'hui disponibles, leur usage implique de nombreuses contraintes qui ne les rendent pas disponibles à large échelle. Leur hébergement et leur manipulation sont couteux et exigent des autorisations et des compétences difficiles à obtenir. Associées à la volonté de la société civile de diminuer l'utilisation de ces espèces en expérimentation, ces contraintes limitent l'utilisation des macaques aux dernières phases de découverte et de développement de médicaments.

3.4 Les singes sud-américains et les parasites humains

Seuls deux genres d'animaux sont naturellement sensibles à l'infection par *P. falciparum* et *P. vivax*, les principaux parasites humains. Il s'agit de deux genres de platyrhiniens (ou singes du nouveau monde): *Aotus spp.* et *Saimiri spp.* [10, 11, 30]. Les premières infections expérimentales de ces singes eurent lieu dans les années 1960 avec des parasites isolés de patients humains infectés [28, 109]. Depuis, ces espèces ont été largement utilisées pour le développement de stratégies vaccinales antipaludiques [30, 31].

L'infection de ces animaux nécessite une adaptation préalable des souches humaines, qu'elles soient de culture où isolées de patients. De nombreuses souches de *P. falciparum* et *P. vivax* ont aujourd'hui été adaptées aux espèces les plus couramment utilisées que sont *Aotus trivirgatus*, *A. lemurinus*, *Saimiri sciureus* et *S. boliviensis* [11]. De plus, il peut être nécessaire de procéder à la splénectomie des singes avant l'infection, car la rate peut rendre le développement de la parasitémie aléatoire. Cependant l'utilisation de certaines souches de parasite dans des lignées particulières de primate permet tout de même d'obtenir des profils de parasitémie exploitables chez des animaux non splénectomisés [13].

Les souches parasitaires adaptées chez des singes splénectomisés développent une parasitémie à la croissance fulgurante, qui provoque la mort de l'animal en l'absence de traitement.

Ces modèles ont très peu été utilisés pour l'évaluation des molécules antipaludiques. La plupart des essais ayant eu lieu dans ce contexte ont été des tests *ex vivo*, évaluant l'effet antipaludique du sérum de singes traités par les molécules étudiées [47, 108]. Pourtant ces animaux présentent de nombreux avantages : ils sont petits et leur achat et leur entretien sont d'un coût moindre que ceux des macaques. La physiopathologie de leur infection a été très bien étudiée et reproduit assez fidèlement la pathologie humaine, par exemple le paludisme cérébral [32].

Les expériences rapportées dans la partie suivante ont pour but de développer un modèle d'essai de molécules antipaludiques chez le singe écureuil, *S. sciureus*, et d'évaluer son utilisation dans un cas concret de développement médicamenteux.

4 Développement d'un modèle d'essai de molécules antipaludiques chez le singe écureuil (Saimiri sciureus)

4.1 Introduction

Pour être utilisé à l'échelle industrielle, un modèle d'infection de PNH par *P. falciparum* doit posséder plusieurs caractéristiques : être standardisé et avoir des contrôles positif et négatif fiables. Pour développer un tel modèle, nous avons fait le choix d'utiliser des singes écureuils (*S. sciureus*), facilement disponibles et pour lesquels la souche de *P. falciparum* dont nous disposions à l'Institut Pasteur de Paris (souche FUP-89F5) avait été adaptée auparavant [50, 101]. Ces animaux ont été splénectomisés afin de permettre une standardisation facile de la parasitémie dans le cadre d'une première infection.

La première étape de notre travail a été de ré-initier une infection des animaux à partir de cryostabilats anciens conservés dans l'azote liquide. Ceci a permis de s'assurer de leur viabilité et d'en produire de nouveaux afin de procéder ensuite aux essais dans des conditions maîtrisées.

Il nous fallait également déterminer quel serait notre contrôle positif. Pour cela, nous avions besoin d'une molécule couramment utilisée en clinique et à laquelle le parasite est complètement sensible. Le profil de sensibilité de FUP-89F5 étant inconnu, nous avons d'abord procédé à des essais *in vitro* selon la méthode de Desjardins *et al.* [17].

Notre souci de standardisation des expériences concernait aussi la méthode d'estimation de la parasitémie des animaux. Celle-ci se devait d'être rapide, fiable, précise et indépendante du manipulateur. Pour ce faire nous avons adapté une méthode d'évaluation de la parasitémie mise au point chez les rongeurs, utilisant un marquage fluorescent et la cytométrie de flux [53, 107].

Enfin, nous avons mis en œuvre le modèle développé ici lors de l'essai d'une molécule antipaludique en cours de développement par l'Unité d'Immunologie Moléculaire des Parasites de l'Institut Pasteur de Paris : CD3, un inhibiteur de protéases de *P. falciparum*.

4.2 Matériel et méthodes

Toutes les études ont été approuvées par le Comité d'éthique de VetAgro Sup (Campus vétérinaire, Marcy l'Étoile, France) sous les numéros 1118 et 1126.

4.2.1 Molécules et produits chimiques

La liste des produits chimiques et réactifs utilisés et disponibles commercialement, ainsi que leurs références et fournisseurs, est présentée en *Annexe 1*.

Les molécules antipaludiques suivantes, utilisées lors du test de Desjardins (voir paragraphe 4.2.6) ont été fournies par l'Institut de Médecine Tropicale du Service de Santé des Armées (Marseille, France) :

dihydroartémisinine ;

- · méfloquine;
- monodéséthylamodiaquine;
- artésunate ;
- · chloroquine;
- luméfantrine.

Le sérum humain décomplémenté et les érythrocytes humains utilisés pour la culture parasitaire *in vitro* ont été fournis par l'Établissement Français du Sang (Rungis, France).

4.2.2 Culture de Plasmodium falciparum in vitro

Trois clones de *P. falciparum* adaptés à la culture *in vitro* ont été utilisés : Dd2, 3D7 et FUP-89F5. Les deux premiers ont été obtenus auprès du *Malaria Research and Reference Reagent Resource Center*. Le clone FUP-89F5 adapté à la culture *in vitro* provient de la collection de l'Unité d'Immunologie Moléculaire des Parasites de l'Institut Pasteur. Les parasites ont été maintenus en culture *in vitro* selon la méthode de Trager et Jensen [94].

Les parasites ont été maintenus en culture dans des flacons de polystyrène. Le milieu de culture était composé de milieu RPMI 1640 contenant de la L-glutamine et du tampon HEPES (voir composition en *Annexe 1*), enrichi de sérum humain décomplémenté (groupe AB+, concentration de 10% v/v), d'hypoxanthine (100 μ M, soit 13,6 mg/L) et de gentamycine (105 nM soit 50 ng/mL), ainsi que d'érythrocytes humains frais du groupe A+. L'hématocrite du milieu de culture était fixé à 5%. Les cultures étaient incubées à 37°C en atmosphère composée de 5% d'O₂, 5% de CO₂ et 90% de N₂.

Quotidiennement, la parasitémie des cultures était évaluée par examen microscopique d'un frottis sanguin coloré au Giemsa, comme décrit au paragraphe 4.2.5.1. En entretien, un passage quotidien des cultures était réalisé en diluant une aliquote dans du milieu frais de manière à atteindre une parasitémie de 1%.

4.2.3 Infection des souris par Plasmodium berghei

Huit souris de la lignée Swiss (numérotées de 1 à 8) ont été infectées avec *P. berghei* de la souche ANKA, fourni par le groupe de recherche sur le paludisme du centre médical de l'Université de Leiden (Pays Bas). 100 000 érythrocytes parasités mis en suspension dans du DPBS 1X ont été injectés par voie IP.

Les parasitémies étaient suivies quotidiennement par examen microscopique de frottis sanguins comme décrit au paragraphe 4.2.5.1. Des échantillons de sang ont été prélevés quotidiennement à la queues et fixés dans la glutaraldéhyde pour

analyse ultérieure par cytométrie de flux grâce au marquage au YOYO-1 comme décrit au paragraphe 4.2.5.2.

4.2.4 Infection des singes écureuils par Plasmodium falciparum

Cinq singes *S. sciureus* mâles adultes (entre 2 et 3 ans, numéros 10 à 14) de phénotype guyanais (caryotype 14-7) provenant de l'élevage établi à la station de primatologie du CNRS (Rousset, France) ont été utilisés. Ces animaux étaient issus d'animaux élevés pour l'expérimentation (génération F2) et étaient naïfs de paludisme avant ce travail.

L'hébergement et les protocoles d'études ont été réalisés dans l'animalerie de Cynbiose SAS (Marcy l'Étoile, France) dans le respect de la législation française et des recommandations concernant l'utilisation des PNH en recherche biomédicale [66].

4.2.4.1 Splénectomie

Les animaux ont été splénectomisés entre 3 et 5 semaines avant le début des infections.

Les protocoles anesthésique, analgésique et antibioprophylactique étaient les suivant :

Anesthésie :

- o Kétamine (75 mg/kg, voie intramusculaire (IM));
- o Midazolam (1,3 mg/kg, IM);

Analgésie :

- Buprénorphine (20 μg/kg, IM): trente minutes avant le début de la chirurgie puis deux heures après la première injection;
- Kétoprofène (2 mg/kg, IM): trente minutes avant le début de la chirurgie, puis une fois par jour les deux jours suivants;

Antibioprophylaxie :

 Amoxicilline (15 mg/kg, SC): trente minutes avant le début de la chirurgie, puis une fois par jour les quatre jours suivants.

Après la tonte et la désinfection de l'abdomen, une incision de deux centimètres a été faite dans la peau du flanc gauche et les muscles sous-jacents à un centimètre et parallèlement à la dernière côte. La rate a été isolée puis extériorisée. Les principaux troncs vasculaires ont été ligaturés et la rate a été excisée. Les couches musculaires et la peau ont été suturées séparément.

4.2.4.2 Infection des singes

Au jour 0 de l'infection, les animaux 10 et 11 ont reçu par voie IV des érythrocytes parasités par le clone FUP-89F5 de *P. falciparum* [22].



Figure 2 : Singe écureuil (Saimiri sciureus) mâle de 3 ans Crédit photographique : Cynbiose SAS

Un prélèvement sanguin était réalisé quotidiennement par ponction au talon, afin de suivre l'évolution des parasitémies par examen microscopique de frottis sanguins, et de fixer du sang pour quantification ultérieure de la parasitémie par cytométrie de flux grâce au marquage par YOYO-1 comme décrit au paragraphe 4.2.5.2.

Dès que la parasitémie a dépassé 8%, 3 mL de sang parasité ont été collectés sur tubes héparinés pour préparer de nouveaux cryostabilats de cette souche de *P. falciparum* adaptée au *S. sciureus*. Le même jour, les animaux étaient traités avec un traitement de référence (β-artééther) selon le protocole suivant :

T₀: 4,6 mg/kg IM

T₀+6h: 1,6 mg/kg IM
 T₀+24h: 1,6 mg/kg IM
 T₀+48h: 1,6 mg/kg IM

• T₀+72h : 1,6 mg/kg IM

Les parasitémies ont encore été surveillées quotidiennement pendant deux semaines après la disparition totale des parasites du sang, puis hebdomadairement pendant encore quatre semaines, pour s'assurer de l'absence de recrudescence parasitaire.

4.2.4.3 Évaluation de l'effet antiparasitaire in vivo

Au jour 0 de l'infection, les animaux 12, 13 et 14 ont reçu 10⁷ érythrocytes parasités par voie intraveineuse, à partir des cryostabilats frais provenant de l'infection du singe 11.

Les parasitémies ont été suivies quotidiennement par examen microscopique de frottis sanguins, et des prélèvements ont été fixés dans la glutaraldéhyde pour quantification ultérieure de la parasitémie par cytométrie de flux, comme décrit au paragraphe 4.2.5.2.

Dès que la parasitémie a dépassé 0,5%, les animaux ont été traités selon protocole suivant :

- Animal 12 : traitement par le β-artééther comme décrit plus haut ;
- Animal 13 : traitement par le véhicule de CD3 selon le protocole suivant :

 \circ T₀: 2,5 mL/kg IP

 \circ T₀+24h : 2,5 mL/kg IP \circ T₀+48h : 2,5 mL/kg IP \circ T₀+72h : 2,5 mL/kg IP

• Animal 14 : traitement avec CD3 selon le protocole suivant :

○ T₀: 50 mg/kg IP

 $_{\odot}$ T₀+24h : 50 mg/kg IP

 \circ T₀+48h : 50 mg/kg IP \circ T₀+72h : 50 mg/kg IP

Les parasitémies ont encore été surveillées quotidiennement pendant deux semaines après la disparition totale des parasites du sang, puis hebdomadairement pendant encore quatre semaines, pour s'assurer de l'absence de recrudescence parasitaire.

4.2.5 Détermination de la parasitémie

4.2.5.1 Microscopie optique

L'analyse microscopique des prélèvements de culture *in vitro* de *P. falciparum* ou de sang périphérique des souris et singes écureuils infectés a été faite sur des frottis sanguins. Ceux-ci étaient fixés au méthanol puis colorés durant 20 minutes dans du Giemsa dilué à 10% dans un tampon de pH 7,2, selon le protocole décrit dans la littérature [11]. Au moins 2000 érythrocytes étaient examinés par frottis.

4.2.5.2 Marquage et analyse par cytométrie de flux des échantillons parasités

 $2,5~\mu L$ de sang ont été prélevés quotidiennement des cultures, souris et singes infectés, fixés dans $500~\mu L$ de glutaraldéhyde (0,04% dans du DPBS 1X) et conservés à 4°C jusqu'au marquage par YOYO-1. Il s'agit d'un marqueur se fixant à l'ADN, et émettant une lumière fluorescente lorsqu'il est excité par le laser d'un cytomètre.

Le marquage de ces échantillons était réalisé la veille de l'analyse par cytométrie de flux. Le protocole de marquage au YOYO-1 utilisé est le suivant. Il a été adapté de Jiménez et al. [43] :

- Centrifugation des échantillons à 377 g, pendant 5 minutes à température ambiante ;
- Retrait du surnageant (glutaraldéhyde) par retournement des tubes ;
- Ajout dans chaque tube de 500 µL de Triton X100 (dilué à 0,25% dans du DPBS 1X);
- Incubation durant 10 minutes à température ambiante. Le Triton X100 permet alors la perméabilisation des cellules sanguines;
- Centrifugation des échantillons à 377 g, pendant 5 minutes à température ambiante;
- Retrait du surnageant (Triton X100) par retournement des tubes ;
- Ajout dans chaque tube de 500 μL de RNase A/T1 mix (diluée à 0,05 mg/mL dans du DPBS 1X);
- Incubation durant 3 heures en étuve à 37°C. Les RNases dégradent l'ARN présent dans les parasites, les leucocytes et les réticulocytes;
- Ajout de 20 µL de YOYO-1 dilué à 0,01 mM dans du DPBS 1X ;

- Incubation pendant au minimum 12 heures à 4°C (durant la nuit entre le marquage et l'analyse). Le YOYO-1 se fixe à l'ADN présent dans les parasites et les leucocytes;
- Le jour de l'analyse : centrifugation des échantillons à 377 g, pendant 5 minutes à température ambiante ;
- Retrait du surnageant (RNase et YOYO-1) par retournement des tubes ;
- Remise en suspension dans 500 μL de DPBS 1X ;
- Conservation à 4°C jusqu'à l'analyse.

L'analyse a été réalisée grâce à un cytomètre de flux FACSCalibur associé au logiciel d'acquisition CellQuest de Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA).

Les voltages du cytomètre ont été réglés grâce à un échantillon non parasité de manière à visualiser la population cellulaire sanguine totale sur un diagramme FSC (*Forward Scatter*, corrélé à la taille des cellules) / SSC (*Side Scatter*, corrélé à la structure interne des cellules) (Voir Figure 5, colonne de gauche). Ces deux paramètres étaient acquis sur une échelle logarithmique.

La région correspondant à la population cellulaire était sélectionnée et visualisée dans un diagramme FL1 / FL2. FL1 est la fluorescence de longueur d'onde 530 nm (±30) émise par les cellules. FL2 est la fluorescence de 585 nm (±42). Les deux paramètres étaient acquis en échelle logarithmique.

Un échantillon parasité était alors utilisé pour ajuster les compensations de manière à discriminer les événements fluorescents en YOYO-1 (*i.e.* les cellules comportant de l'ADN, émettant principalement en FL1) de l'autofluorescence (*i.e.* la totalité de la population cellulaire, émettant exclusivement en FL2) (habituellement FL1-20% FL2).

Tous les échantillons ont été acquis jusqu'à ce que 500 000 événements correspondant à la région de la population cellulaire totale aient étés enregistrés.

Le logiciel FlowJo de Tree Star, Inc. (Ashland, OR, USA) a été utilisé pour l'analyse post-acquisition des données. Les régions correspondant à la population cellulaire totale et aux érythrocytes infectés ont été redéfinies. À cause de légères différences dans la morphologie cellulaire entre les individus, ces régions ont dues être ajustées pour chaque individu. La parasitémie a été déduite du nombre d'événements fluorescents dans FL1 (fluorescence due à YOYO-1).

4.2.6 Évaluation in vitro de la résistance aux molécules antipaludiques

Pour valider l'utilisation du modèle de *S. sciureus* infecté par *P. falciparum*, il était indispensable de sélectionner un traitement adapté, pour servir de contrôle positif lors des tests d'efficacité de nouvelles molécules. Le spectre de sensibilité du clone FUP-89F5 n'est pas très documenté. Il a donc été réalisé un test de sensibilité à sept molécules antipaludiques classiquement utilisées grâce à la technique des

micro-dilutions semi-automatique de Desjardins [17]. Deux autres clones de *P. falciparum* ont été utilisés comme contrôles : 3D7, sensible à tous les antipaludiques commercialement disponibles, et Dd2, résistant à la chloroquine, la quinine, la pyriméthamine et la sulfadoxine [23].

Sept molécules ont été testées : la dihydroartémisinine (DHA), la méfloquine (MQ), la monodéséthylamodiaquine (mAQ), l'artésunate (AS), la chloroquine (CQ), la quinine (QU) et la luméfantrine (LU). L'échelle de concentration a été choisie pour chaque molécule de manière à encadrer l'EC₅₀ (*Efficient Concentration 50%*) attendue.

Le protocole suivant décrit la manipulation pour l'évaluation des molécules sur une souche :

 Deux plaques de 96 puits sont remplies d'un milieu de culture composé de milieu RPMI 1640 contenant de la L-glutamine et du tampon HEPES (voir composition en *Annexe 2*), enrichi de 10% de sérum humain décomplémenté (groupe AB+, concentration de 10% v/v), d'hypoxanthine (10 μM, soit 1,36 mg/L) et de gentamycine (105 nM soit 50 ng/mL).

Ce milieu a la même composition que le milieu de culture classique (décrit dans le paragraphe 4.2.2), excepté qu'il est dix fois moins concentré en hypoxanthine ;

- Dans ce milieu de culture, chaque molécule à tester, y compris les produits contrôles (solvants des molécules), est diluée en séries sur deux colonnes en parallèle;
- Une culture asynchrone de la souche de *P. falciparum* à tester est diluée puis ajoutée de manière à atteindre finalement dans chaque puits une parasitémie de 0,5%, un hématocrite de 1% et une concentration finale des molécules telle que décrite en Annexe 3 ;
- Les plaques de 96 puits sont incubées à 37°C en atmosphère composée de 5% d'O₂, 5% de CO₂ et 90% de N₂. Durant l'incubation, la multiplication des parasites dans chaque puits est plus ou moins inhibée en fonction de la concentration en molécule et de la sensibilité propre de la souche ;
- Après 24 heures, de l'hypoxanthine tritiée est ajoutée en excès dans chaque puits, et l'incubation reprend pour encore 24 heures. Les parasites vivants ayant souffert d'un défaut d'hypoxanthine jusqu'ici, incorporent alors de manière très efficace l'hypoxanthine radioactive;
- Au bout de ces 24 heures, soit après 48 heures d'incubation, le contenu cellulaire de chaque puits est transféré sur un filtre en fibre de verre grâce à

un récolteur de cellules Mach IIIM-FM de TomTec (Hamden, CT, USA), puis la radioactivité incorporée est mesurée grâce à un compteur MicroBeta² de PerkinElmer (Waltham, MA, USA). Le niveau d'incorporation de la radioactivité d'un puits indique le taux de multiplication des parasites, donc la sensibilité du parasite à la concentration de molécule dans ce puits ;

L'EC₅₀, c'est à dire la concentration de molécule diminuant de 50% la multiplication du parasite (par rapport à des parasites se multipliant en l'absence d'inhibiteur) est déterminée pour chaque colonne par régression non linéaire grâce au logiciel HN-NonLin V1.1 [69]. Chaque molécule étant testée sur deux colonnes par plaque, l'EC₅₀ finale d'une molécule est la moyenne des deux EC₅₀ obtenues sur les deux colonnes.

Ce protocole a été répété quatre fois sur chacune des trois souches différentes. Ceci représente 24 plaques de 96 puits et permet d'obtenir une EC₅₀ moyenne et un écart type pour chaque combinaison souche/molécule.

4.2.7 Tests statistiques

L'analyse statistique des données a été effectuée grâce au logiciel R [39].

4.3 Résultats

4.3.1 Évaluation in vitro de la sensibilité aux médicaments

La Figure 3 présente le résultat d'un test de Desjardins réalisé avec de l'artésunate sur le clone FUP-89F5. Le graphique représente le taux de multiplication des parasites, en pourcentage du taux maximum trouvé lors de cette expérience (soit en l'absence de molécule inhibitrice), en fonction de la concentration en molécule. La courbe rouge est la courbe de régression polynomiale du troisième degré calculée à partir de ces données. Son coefficient de corrélation est R², ici égal à 0,9912. Les valeurs des concentrations efficaces (EC) sont calculées à partir de la courbe de régression. Pour cette expérience, l'EC₅₀ était de 1,293 nM.

Les résultats présentés dans le Tableau I sont les moyennes et les écarts types des EC₅₀ obtenues lors des quatre tests de Desjardins réalisés (on rappelle que sept molécules ont été testées sur trois souches différentes lors de quatre expériences indépendantes). Les EC₅₀ obtenues pour le clone FUP-89F5 sont du même ordre de grandeur que celles obtenues avec le clone sensible 3D7 et suggèrent que FUP-89F5 est sensible à toutes les molécules testées. Un test non paramétrique de comparaison des moyennes de Kruskall-Wallis a été réalisé pour chaque molécule et confirme qu'il n'y a pas de différence significative des EC₅₀ pour les deux molécules dérivées de l'artémisinine (la dihydroartémisinine et l'artésunate, p>0,05).

Tableau I : EC₅₀ de sept molécules antipaludiques sur trois clones de P. falciparum

	FUP	-89F5	3	D7		d2	Kruskall-Wallis (* : p<0,05)
Dihydroartémisinine	0,53	(± 0,12)	0,59	(± 0,08)	0,59	(± 0,12)	_
Méfloquine	6,40	(± 0,55)	20,58	(± 3,40)	13,23	(± 3,92)	*
Monodéséthylamodiaquine	7,26	(± 1,68)	5,72	(± 1,60)	18,11	(± 2,75)	*
Artésunate	1,04	(± 0,27)	0,99	(± 0,38)	1,45	(± 0,21)	
Chloroquine	13,65	(± 4,56)	19,73	(± 18,01)	71,55	(± 14,26)	*
Quinine	54,77	(± 17,49)	65,75	(± 17,24)	184,39	(± 36,58)	*
Luméfantrine	11,19	(± 1,67)	42,55	(± 8,39)	36,25	(± 1,89)	*

EC	Conc		
EC50	1,293		
EC90	2,760		
EC95	3,037		
EC99	3,290		

Correl	
R ²	0,9912
100	
Delement	•
Polynome	3

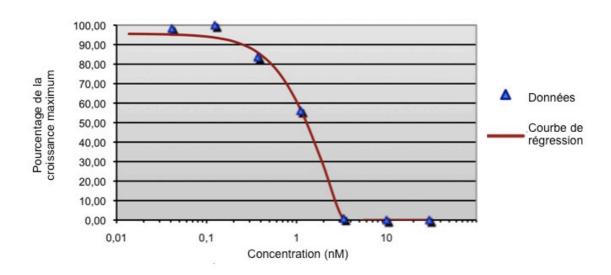


Figure 3 : Détermination d'une EC₅₀ par régression polynômiale

Tirée du logiciel HN-NonLin V1.1 [69]

En conséquence, le traitement choisi pour les singes infectés a été une formulation de β-artééther, un autre dérivé de l'artémisinine, injectable par voie IM (Artecef 50, ACE pharmaceuticals, Zeewolde, Pays-Bas).

4.3.2 Infection de singes écureuils (Saimiri sciureus) par Plasmodium falciparum

Le premier objectif de cette étude était de relancer le modèle de singes écureuils (*S. sciureus*) infectés par *P.* falciparum. Deux animaux splénectomisés (singes 10 et 11) ont été infectés par le clone 89F5 adapté au saïmiri de la souche Uganda Palo Alto (ou souche FUP), provenant de la collection de l'Institut Pasteur. Un stabilat du clone FUP-89F5 a été injecté aux deux singes par voie IV. La parasitémie était contrôlée quotidiennement par examen microscopique de frottis sanguin (Figure 4, lignes bleues). 2,5 µL de sang ont été prélevés chaque jour et fixés dans de la glutaraldéhyde pour analyse ultérieure de la parasitémie par cytométrie de flux. Les premiers parasites circulants ont été détectés le quatrième jour post-infection chez les deux animaux.

Dès que la parasitémie a dépassé 8% (les jours 6 et 8 pour les animaux 10 et 11 respectivement), 3 mL de sang ont été prélevés sur tubes héparinés pour préparer des cryostabilats frais du clone FUP-89F5. 22 cryostabilats ont ainsi été produits puis congelés à -80°C avant d'être transférés dans l'azote liquide pour une conservation de longue durée.

Le même jour, les deux animaux ont reçu la première injection du traitement par le β-artééther.

Dès le deuxième jour du traitement, et ce chez les deux animaux, la majorité des parasites observés au frottis étaient pycnotiques (65% et 55% pour les animaux 10 et 11 respectivement). À partir du troisième jour de traitement, tous les parasites observés étaient pycnotiques. Ces parasites pycnotiques circulants ont ensuite progressivement disparu en moins de deux semaines. Les courbes de la Figure 4 ne prennent en compte que les parasites vivants circulants.

Les animaux 10 et 11 ont été suivis deux fois par semaine durant un mois après la fin du traitement grâce à un frottis sanguin, et aucun parasite n'est réapparu.

4.3.3 Évaluation de la parasitémie par cytométrie de flux

4.3.3.1 Technique de cytométrie de flux

4.3.3.1.1 Prélèvements de cultures in vitro de Plasmodium falciparum

Cette méthode de détermination de parasitémie a d'abord été testée sur deux clones de *P. falciparum* (3D7 et FUP-89F5) cultivés *in vitro*.

Pour évaluer la capacité de cette technique à détecter de faibles parasitémies, les deux cultures ont été diluées à une parasitémie de 0,05%. Elles ont ensuite été laissées évoluer et ont été suivies quotidiennement par examen microscopique.

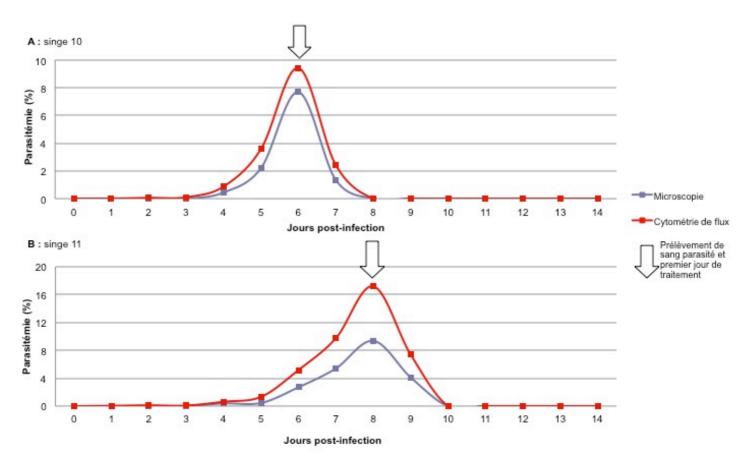


Figure 4 : Infection initiale des singes 10 et 11 par P. falciparum suivie par microscopie optique et cytométrie de flux

Un échantillon de 2,5 µL de chaque culture était collecté et fixé chaque jour dans la glutaraldéhyde pour l'analyse ultérieure de la parasitémie par cytométrie de flux. Après 6 jours de suivi, tous les échantillons ont été marqués au YOYO-1 et analysés par cytométrie de flux. La Figure 5-A illustre l'analyse de l'échantillon de la culture de 3D7 au jour 6.

La première étape de l'analyse consistait à visualiser l'ensemble des événements mesurés, sur un diagramme représentant la complexité de leur structure (axe FSC) en fonction de leur taille (axe SSC) (Figure 5-A, graphique de gauche).

Le groupe d'événements représentant les cellules sanguines était sélectionné puis visualisé sur le graphique FL1/FL2 (FL1 représentant la fluorescence du YOYO-1, FL2 l'autofluorescence des cellules) (Figure 5-A, graphique du milieu). La population fluorescente en YOYO-1, correspondant aux globules rouges parasités était enfin sélectionnée pour la quantifier et obtenir ainsi une parasitémie, ici évaluée à 15,53%.

4.3.3.1.2 Prélèvements de souris infectées par Plasmodium berghei

Le même protocole, adapté de Jiménez-Díaz *et al.* [43], a été utilisé pour évaluer la parasitémie de huit souris infectées par *P. berghei*, dans le but de s'assurer de sa faisabilité et de sa répétabilité *in vivo*.

Durant six jours après l'infection, les parasitémies ont été suivies par examen microscopique de frottis sanguins, et des prélèvements de sang ont été fixés dans la glutaraldéhyde. Tous ces échantillons ont été ensuite marqués au YOYO-1 et analysés par cytométrie de flux.

La Figure 5-B détaille l'analyse de l'échantillon provenant de la souris 7 au jour 6 post-infection. Le protocole appliqué est le même que sur la Figure 5-A.

Après l'identification des leucocytes, qui étaient absents des cultures *in vitro*, dans le coin supérieur droit du graphique FL1/FL2, la sélection des érythrocytes parasités permet d'évaluer la parasitémie à 10,88%.

4.3.3.1.3 Prélèvements de saïmiris infectés par Plasmodium falciparum

Finalement, ce protocole a été adapté aux échantillons de sang prélevés quotidiennement des singes 10 et 11 infectés par *P. falciparum*. La Figure 5-C illustre la quantification de la parasitémie dans le prélèvement provenant du singe 11 au jour 7 post-infection. La sélection des globules rouges fluorescents (Figure 5-C, graphique du milieu) indique une parasitémie de 9,8%.

Cette méthode de mesure de la parasitémie a été appliquée à tous les prélèvements provenant des cultures de *P. falciparum in vitro*, des souris infectées par *P. berghei* et des singes écureuils infectés par *P. falciparum*. Des prélèvements de milieu de culture avant ensemencement et de sang des animaux avant infection ont été utilisés comme contrôles négatifs. Les valeurs de bruit de fond obtenues lors de l'analyse de ces prélèvements par cytométrie de flux ont été soustraites de celles obtenues après ensemencement ou infection.

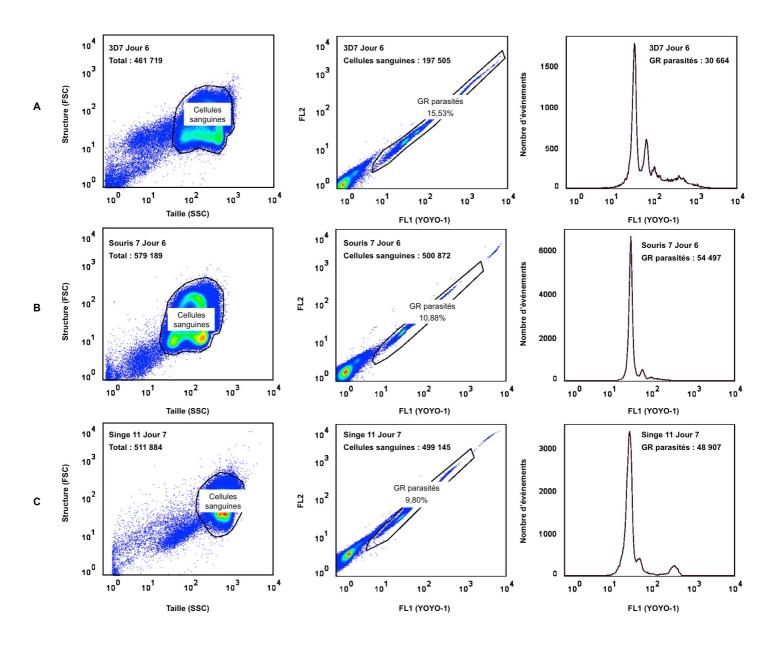


Figure 5 : Détermination de la parasitémie par cytométrie de flux

A : prélèvement de culture in vitro ; B : prélèvement de souris ; C : prélèvement de singe écureuil

Les parasitémies obtenues par quantification grâce à la cytométrie de flux à partir des prélèvements des singes 10 et 11 ont été reportées sur la Figure 4 (lignes rouges). Elles sont toujours plus élevées que celles obtenues par examen microscopique des frottis sanguins, et présentent la même évolution dans le temps.

4.3.3.2 Corrélation des techniques de détermination de la parasitémie

Les graphiques de la Figure 6représentent les parasitémies obtenues par cytométrie de flux en fonction de celles obtenues par examen microscopique des frottis sanguins pour chaque expérience. Cette représentation permet d'évaluer la corrélation entre ces deux méthodes.

Dans tous les cas, les deux techniques présentent une forte corrélation linéaire (R²>0,99). Les coefficients directeurs des droites de régression sont de 1,6199 pour les cultures de *P. falciparum in vitro* (Figure 6-A), 1,5743 pour les souris infectées par *P. berghei* (Figure 6-B), et 1,7565 pour les singes écureuils infectés par *P. falciparum* (Figure 6-C).

4.3.3.3 Distinction des parasites pycnotiques par la cytométrie de flux

La fluorescence de YOYO-1 dans les cellules peut être représentée sous forme d'histogramme montrant le nombre d'événements fluorescents en fonction de leur intensité de fluorescence (Figure 5, colonne de droite). L'intensité de fluorescence de YOYO-1 dépend de la quantité d'ADN contenue dans chaque cellule : les pics de fluorescence situés entre 10¹ et 10² Unités de Fluorescence (UF) correspondent aux érythrocytes parasités par un trophozoïte (pic principal) ou plusieurs (pics secondaires), tandis que les érythrocytes infectés par un schizonte apparaissent entre 10² et 10³ UF [43]. Les leucocytes, quand ils sont présents dans l'échantillon, ont une intensité de fluorescence supérieure à 10³ UF.

Comme cela a été mentionné au paragraphe 4.3.2, à partir du deuxième jour de traitement des singes 10 et 11, la majorité (65% et 55% respectivement) des parasites circulants vus à l'examen des frottis sanguins étaient pycnotiques. Au troisième jour de traitement, tous les parasites détectés étaient pycnotiques, plus aucun parasite vivant n'était observé. L'apparition de cette nouvelle population de parasites a pu être mise en évidence par cytométrie de flux grâce à l'histogramme de fluorescence de YOYO-1.

La Figure 7 présente cet histogramme pour trois prélèvements du singe 11, juste avant le premier traitement (Figure 7-A) et les deuxième (Figure 7-B) et troisième (Figure 7-C) jours du traitement (i.e. les jours 8, 9, et 10 post-infection).

Avant le traitement, le principal pic visible, ayant une intensité de fluorescence moyenne de 42,4 UF, correspond aux érythrocytes infectés par un unique trophozoïte.

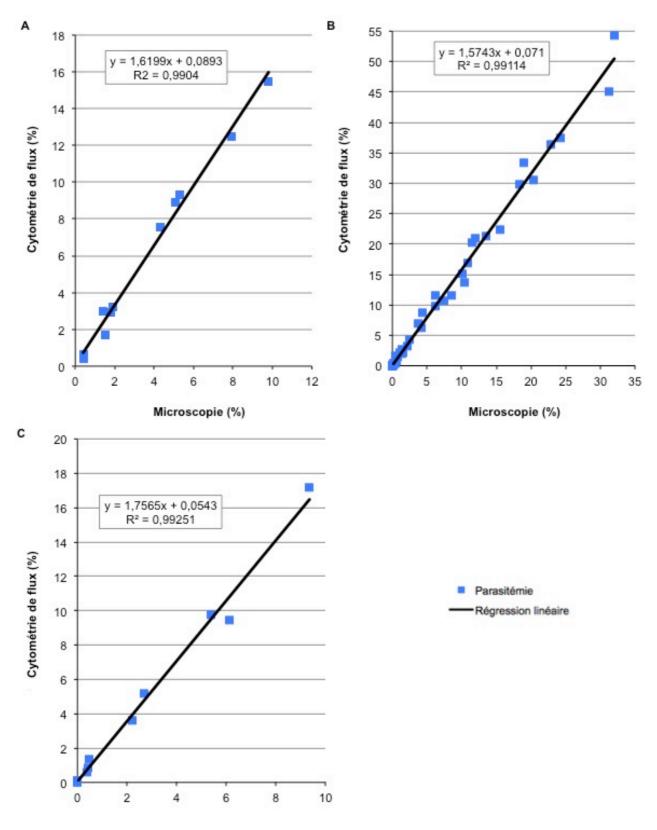


Figure 6 : Corrélation des techniques de détermination de la parasitémie

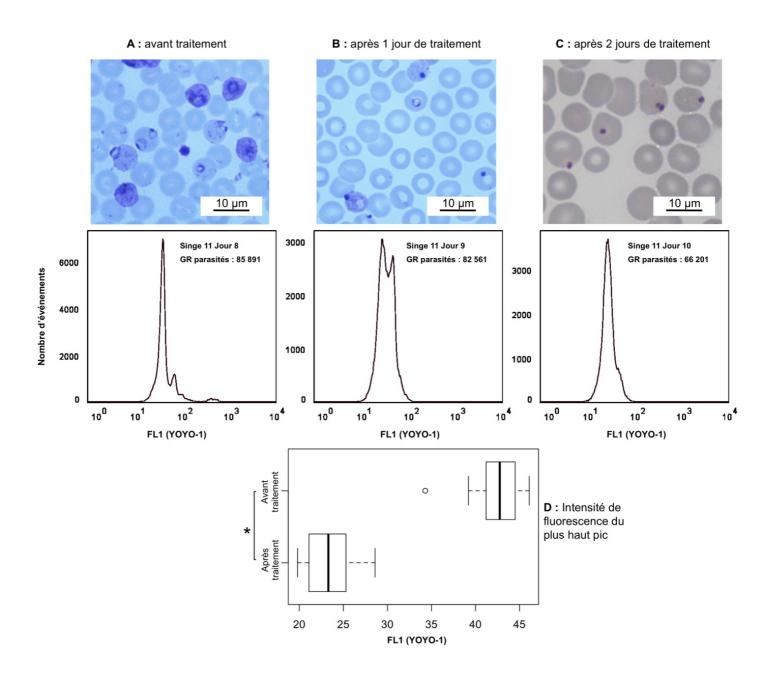


Figure 7 : Distinction des formes pycnotiques de Plasmodium falciparum par cytométrie de flux

Au deuxième jour de traitement, un nouveau pic ayant une intensité de fluorescence moyenne de 23,5 UF apparaît. Ce pic, correspondant aux parasites pycnotiques, a un intensité de fluorescence moyenne significativement plus faible que celui correspondant aux érythrocytes infectés par un trophozoïte (Test de Student non apparié, p<0,01). Ceci permet une distinction aisée des deux populations (Figure 7-D). Tous les autres pics disparaissent, ce qui suggère que ni les érythrocytes infectés par de multiples trophozoïtes, ni ceux infectés par un schizonte ne sont détectables.

La population d'érythrocytes infectés par un unique trophozoïte n'est plus détectable au troisième jour de traitement, tandis que seuls les parasites pycnotiques sont encore détectés.

4.3.4 Évaluation in vivo de l'activité anti-P. falciparum de CD3, un inhibiteur de Plasmodium-SUB1

Trois singes (numéros 12 à 14) ont été infectés grâce à un cryostabilat frais du clone FUP-89F5 préparé à partir du prélèvement du singe 11 (Figure 4). Ces animaux ont reçu 10^7 globules rouges parasités par kilogramme de poids corporel. Les trois singes ont développé des parasitémies homogènes d'environ 0,7% au jour 6 post-infection, ce qui a déclenché le début des traitements décrits au paragraphe 4.2.4.3. La Figure 8 représente le suivi de la parasitémie déterminée par cytométrie de flux pour chaque singe.

Comme observé lors de la première expérience (Figure 4), le traitement au β -artééther a permis l'élimination de tout parasite vivant de la circulation en deux jours. La parasitémie du singe 13 (véhicule de CD3) a évoluée de manière équivalente à celles obtenues en l'absence de traitement (Figure 8) et a donc déclenché un traitement au β -artééther au jour 8 post-infection. L'administration de la molécule CD3 a eu un effet radical sur la parasitémie, la réduisant de 92,5% quatre jours après le début du traitement (jour 10 post-infection) par rapport au premier jour de traitement. Cependant, à partir du cinquième jour après le début du traitement la parasitémie a commencé à remonter, et le singe 14 a finalement été traité au β -artééther au jour 12 post-infection.

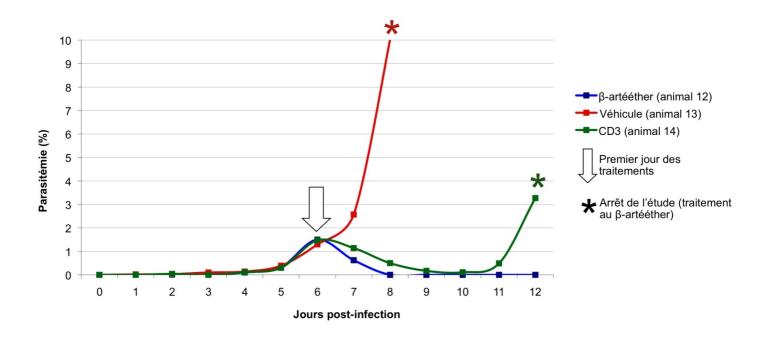


Figure 8 : Évaluation in vivo de l'efficacité antipaludique de CD3

4.4 Discussion

Le besoin de développer un modèle *in vivo* d'infection par *P. falciparum* pour évaluer l'efficacité de nouvelles molécules candidates nous a mené à relancer le modèle de singe écureuil infecté par *P. falciparum*.

Le premier essai d'infection de singes écureuils splénectomisés par le clone FUP-89F5 de *P. falciparum* a réussi puisque les animaux ont développé des parasitémies élevées, dont le profil est en accord avec la littérature [13].

Les niveaux de parasitémie obtenus, ainsi que leur profil, sont rarement atteints en pathologie humaine. Mais du point de vue expérimental, ce modèle d'infection présente l'avantage d'être très reproductible et homogène entre les différents animaux. Chez les animaux splénectomisés, la majorité des parasites circulants détectés par examen des frottis sanguins se sont révélés être de jeunes trophozoïtes. Les érythrocytes infectés par des schizontes ont rarement été observés, ce qui suggère que même en l'absence de la rate, ils sont probablement séquestrés dans le réseau microvasculaire d'autres organes. En effet, les formes mûres (trophozoïtes âgés et schizontes) du clone FUP-89F5 sont connues pour former des rosettes et des agrégats pouvant être retenues dans la circulation capillaire [101].

Au cours de cette première expérience, des cryostabilats frais et à la charge parasitaire quantifiée du clone FUP-89F5 ont pu être produits à partir des deux singes infectés, et leur viabilité a été testée et validée par l'infection de trois autres animaux.

De plus, nous avons pu valider l'utilisation du β-artééther pour le traitement de singes infectés par *P. falciparum*. Il est intéressant de noter que ce traitement avait déjà été utilisé dans le contexte du paludisme simien : des orang-outans du parc zoologique de Singapour ont été traités avec succès contre le paludisme grâce au même protocole [100].

Dans notre étude, deux jours de traitement ont été nécessaires pour éliminer tout parasite vivant de la circulation. Cette observation s'accorde à une précédente publication [56] ayant montré que le temps de clairance du parasite chez des humains présentant un accès palustre simple et ayant reçu un traitement par le β -artééther se situe autour de 35 heures (le même protocole de traitement était utilisé, seule la première dose différait : elle était de 3,2 mg/kg IM à la place de 4,6 mg/kg dans nos expériences).

Le traitement des singes et des humains infectés par *P. falciparum* avec la même molécule donne donc un résultat similaire avec de plus, une absence de rechute détectée après un mois. Ce résultat valide donc l'utilisation de *S. sciureus* infecté par *P. falciparum* en tant que modèle pour évaluer un traitement antipaludique utilisé en pathologie humaine.

L'évaluation de la parasitémie de *Plasmodium* à l'aide de la cytométrie de flux par utilisation du marqueur YOYO-1 a été d'abord développée dans un modèle rongeur [43], pour être ensuite adaptée à la culture *in vitro* de *P. falciparum* puis aux prélèvements humains [7, 53]. Nous avons adapté cette méthode à la mesure de la parasitémie chez les singes écureuils infectés par *P. falciparum*.

Une estimation fiable et précise de la parasitémie, si on la compare à la méthode de référence (la lecture microscopique de frottis sanguins) a pu être obtenue sans changement majeur du protocole.

La méthode microscopique apparaît plus économe en temps et en investissements pour ce qui est de l'évaluation rapide du statut parasitaire d'un animal. Cependant, l'analyse par cytométrie de flux est très adaptée pour le suivi rapide et précis de grandes cohortes d'animaux infectés, par exemple dans le contexte de l'évaluation de candidats traitements. Cette nouvelle méthode permet en effet l'inspection de 250 fois plus d'érythrocytes par échantillon que la microscopie en moins d'une minute, avantage précieux lorsqu'il s'agît d'évaluer un grand nombre d'échantillons.

La plus grande sensibilité de la cytométrie de flux, que l'on peut constater sur la Figure 6 par le coefficient directeur des droites de régression, est illustrée sur la Figure 4 par le fait que les parasitémies déterminées par analyses cytométriques sont systématiquement plus hautes que celles déterminées par analyse microscopique des frottis sanguins. Plusieurs causes peuvent expliquer cette sensibilité accrue. Premièrement, comme précisé plus haut, le nombre d'événements analysés est beaucoup grand lors d'une analyse cytométrique que par examen microscopique. Ainsi la méthode cytométrique apparaît particulièrement adaptée à l'évaluation des parasitémies très faibles. De plus, certains événements qui ne seraient pas détectés ou comptés lors de l'analyse microscopique des frottis sanguins se retrouvent comptabilisés lors de l'analyse cytométrique. Il s'agit par exemple d'invasions avortées de globules rouges, qui se manifestent sous forme de mérozoïtes collés à la surface d'érythrocytes, ou encore de parasites morts.

L'apparition de parasites pycnotiques circulants après traitement d'humains splénectomisés par des dérivés de l'artémisinine a déjà été rapportée [9], et a également été clairement identifiée lors de notre travail (Figure 7). Il est aujourd'hui démontré que la rate est capable d'extraire des corps indéformables des globules rouges sans lyser les cellules, par un procédé appelé « *pitting* » [6]. Newton *et al.* ont montré que ce phénomène est impliqué dans la clairance des parasites tués lors d'un traitement par un dérivé de l'artémisinine [67]. La circulation de parasites pycnotiques pendant plusieurs jours chez les animaux splénectomisés traités par le β-artééther reflète probablement l'absence de filtration par la rate de ces parasites intra-érythrocytaires morts dans notre modèle expérimental.

Lors de notre premier essai d'évaluation d'un candidat traitement contre le paludisme dans le modèle de *S. sciureus* infectés par *P. falciparum*, nous avons infecté trois animaux avec 10⁷ érythrocytes infectés par kilogramme. Cette pondération de la dose infectante est rendue nécessaire par la variabilité de poids des individus composant une cohorte expérimentale, même s'ils appartiennent à une classe d'âge similaire. Il en résulte que les trois animaux ont présenté des parasitémies homogènes, apparaissant au même jour post-infection (Figure 8). Ceci permet le test en parallèle de trois protocoles de traitement différents. Le premier a reproduit le profil de clairance de *P. falciparum* suite à l'injection de β-artééther, confirmant l'efficacité de cette molécule dans le traitement des singes écureuils infectés.

Cette expérience a également permis de démontrer pour la première fois *in vivo* la grande efficacité de CD3, inhibiteur de la protéase SUB1, contre P. falciparum. Il est à noter qu'aucun effet toxique n'a été observé, et que peu de parasites pycnotiques ont été observés suite à l'injection de CD3, contrairement au traitement par le β -artééther. De plus, la chute de la parasitémie a nécessité un délai de 24 heures à la suite de la première injection de CD3, par rapport au traitement par le β -artééther. Ces observations illustrent le fait que CD3 cible spécifiquement les schizontes segmentés alors que le β -artééther est actif contre toutes les formes de P. falciparum intra-érythrocytaires. De plus, les jeunes trophozoïtes circulants ne sont pas ciblés par CD3 avant de devenir des schizontes matures, ce qui pourrait expliquer le délai dans l'effet antiparasitaire.

Le fait que l'injection de CD3 à 50 mg/kg ait réduit de 92,5% la parasitémie en quatre jours de traitement peut être mis en parallèle avec son ED_{50} de 30 mg/kg chez la souris infectée par *P. berghei* selon le test de Peters (données non présentées), sachant que l' ED_{50} de la chloroquine dans ce modèle est de 2 mg/kg. Dans les deux modèles, CD3 montre une forte activité anti-*Plasmodium in vivo*. Cependant il reste à obtenir une augmentation de 30 à 50 fois du pouvoir antiparasitaire de ce candidat traitement pour qu'il atteigne le statut de *lead*.

Bien qu'ils soient très préliminaires, les résultats obtenus lors de ces premières expériences suggèrent que le singe écureuil infecté par *P. falciparum* constitue un modèle approprié pour évaluer *in vivo* l'efficacité de nouvelles molécules contre le cycle érythrocytaire de ce parasite. Plusieurs perspectives pourraient augmenter l'intérêt de ce modèle : adapter des souches résistantes à certaines molécules antipaludiques, ré-initier l'infection par *P. vivax* ou encore, pour évaluer l'effet de molécules sur les formes pré-érythrocytaires, l'initiation de l'infection par des sporozoïtes. D'autre part, la détermination des propriétés pharmacodynamiques de différents traitements antipaludiques chez le saïmiri est nécessaire pour maîtriser les paramètres impliqués dans le développement de molécules dans ce modèle prometteur.

5 Conclusion

Le paludisme est aujourd'hui encore une grave menace pour la santé humaine, contre laquelle aucun vaccin n'est disponible. Les molécules antipaludiques restent donc indispensables. Cependant l'apparition de résistances aux plus récentes d'entre elles compromet l'efficacité des traitements actuellement utilisés. Il apparaît donc urgent de développer de nouvelles molécules.

Dans ce but, la stratégie actuelle des équipes de recherche repose sur l'évaluation *in vitro* de l'effet antipaludique de banques de molécules. Les composants les plus prometteurs sont raffinés et réévalués *in vitro* et *in vivo*. Les modèles animaux présentés peuvent être regroupés en deux catégories. La première repose sur l'association de plasmodies animales à leur hôte naturel (souris, primates). L'autre catégorie combine un parasite humain à une espèce animale naturellement non sensible par le biais d'adaptations de l'hôte ou du parasite.

Le modèle développé ici repose sur la capacité de certaines souches de *P. falciparum* à infecter une espèce de primates sud-américain, *Saimiri sciureus*, après une période d'adaptation. La première partie du travail présenté a consisté à initier une infection par le clone FUP-89F5 de *P. falciparum* conservé par l'Unité d'Immunologie Moléculaire des Parasites de l'Institut Pasteur, chez deux singes. Cela a permis de s'assurer de la viabilité de la souche et de produire de nouveaux cryostabilats utilisables dans la suite de l'étude.

Pour évaluer la parasitémie des animaux de manière reproductible, une méthode de quantification par cytométrie de flux a été appliquée au singe écureuil. Cette technique utilise les propriétés de fluorescence de YOYO-1, un agent marquant l'ADN. Elle permet l'estimation du nombre de globules rouges totaux et parasités, la discrimination entre les différents stades parasitaires, ainsi qu'entre les parasites viables et pycnotiques.

Pour valider ce modèle, une étude préliminaire d'une molécule en cours de développement a été menée. Elle a permis de démontrer la possibilité d'obtenir des parasitémies standardisées, de les suivre par cytométrie de flux, et de comparer l'effet antipaludique de la molécule étudiée à des témoins, positif et négatif.

Au cours de ce travail, le modèle a prouvé sa pertinence. Il peut dors et déjà être utilisé pour l'évaluation préclinique de molécules antipaludiques, et pourra bénéficier de nombreuses améliorations : infection par des souches de *P. falciparum* résistantes, par *P. vivax* ou encore couplage à une étude pharmacocinétique.

Le Directeur général

VetAgro Sup

Par délégation Pr F. Grain - DEVE

VetAgro Sup Campus Vétérinaire

Le Professeur responsable VetAgro Sup, campus vétérinaire

Pr. G. BOURDOISEAU

Le Président de la thèse

Vu et permis d'imprimer

Lyon, le

Pour le Président de l'Université

1 7 NOV. 2019

Le Président du Comité de Coordination des Études Médicales, Professeur F.N GILLY

66

6 Bibliographie

- 1. **Aikawa M., Brown A., Smith C.D., Tegoshi T., Howard R.J., Hasler T.H.** *et al.* (1992). A primate model for human cerebral malaria: *Plasmodium coatneyi*-infected rhesus monkeys. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* **46:**391-397.
- 2. **Badell E., Pasquetto V., Eling W., Thomas A. et Druilhe P.** (1995). Human *Plasmodium* liver stages in SCID mice: a feasible model? *Parasitology Today.* **11:**169-171.
- 3. **Badell E., Pasquetto V., van Rooijen N. et Druilhe P.** (1995). A mouse model for human malaria erythrocytic stages. *Parasitology Today.* **11:**235-237.
- 4. **Biagini G.A., O'Neill P.M., Nzila A., Ward S.A. et Bray P.G.** (2003). Antimalarial chemotherapy: young guns or back to the future? *Trends in parasitology.* **19:**479-487.
- 5. **Blackman M.J.** (2008). Malarial proteases and host cell egress: an 'emerging' cascade. *Cellular Microbiology*. **10:**1925-1934.
- 6. Buffet P.A., Safeukui I., Deplaine G., Brousse V., Prendki V., Thellier M. et al. (2011). The pathogenesis of *Plasmodium falciparum* malaria in humans: insights from splenic physiology. *Blood*. 117:381-392.
- 7. Campo J.J., Aponte J.J., Nhabomba A.J., Sacarlal J., Angulo-Barturen I., Jiménez-Díaz M.B. et al. (2011). Feasibility of flow cytometry for measurements of *Plasmodium falciparum* parasite burden in studies in areas of malaria endemicity by use of bidimensional assessment of YOYO-1 and autofluorescence. *Journal of clinical microbiology.* 49:968-974.
- 8. **Center for Diesease Control and Prevention** (Consulté le 19/102011). DPDx CDC Parasitology Diagnostic Web Site [en ligne]. Adresse: http://www.dpd.cdc.gov/
- 9. Chotivanich K., Udomsangpetch R., Dondorp A.M., Williams T., Angus B., Simpson J.A. *et al.* (2000). The mechanisms of parasite clearance after antimalarial treatment of *Plasmodium falciparum* malaria. *Journal of Infectious Diseases*. **182**:629-633.
- 10. **Collins W.E.** (1989). Major animal models in malaria research: simian. *In Malaria: Principles and Practice of Malariology*, édition n° 1. Édité par Churchill Livingstone, Edimbourg, UK. 1473-1501.
- 11. **Collins W.E.** (2002). Nonhuman Primate Models. *In Malaria Methods and Protocols*, édition n° 1. Édité par Humana Press, Inc., Totowa, NJ, USA. 77-92.
- 12. **Contamin H.** (1998). Le *Saimiri sciureus*, primate du nouveau monde: mise en place d'un modèle expérimental pour étudier la physiopathologie du paludisme humain. Thèse de doctorat vétérinaire. Faculté de Médecine, Créteil. 117 pages.

- 13. Contamin H., Behr C., Mercereau-Puijalon O. et Michel J.-C. (2000). *Plasmodium falciparum* in the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*): infection of non-splenectomised animals as a model for exploring clinical manifestations of malaria. *Microbes and Infection*. **2:**945-954.
- 14. Corcoran K.D., Hansukjariya P., Sattabongkot J., Ngampochjana M., Edstein M.D., Smith C.D. et al. (1993). Causal prophylactic and radical curative activity of WR182393 (a guanylhydrazone) against *Plasmodium cynomolgi* in *Macaca mulatta*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 49:473-477.
- 15. Coslédan F., Fraisse L., Pellet A., Guillou F., Mordmüller B., Kremsner P.G. et al. (2008). Selection of a trioxaquine as an antimalarial drug candidate. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 105:17579-17584.
- 16. Coteron J.M., Marco M., Esquivias J., Deng X., White K.L., White J. et al. (2011). Structure-guided lead optimization of triazolopyrimidine-ring substituents identifies potent *Plasmodium falciparum* dihydroorotate dehydrogenase inhibitors with clinical candidate potential. *Journal of Medicinal Chemistry.* **54**:5540-5561.
- 17. **Desjardins R.E., Canfield C.J., Haynes J.D. et Chulay J.D.** (1979). Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **16:**710-718.
- 18. **Dondorp A.M., Nosten F., Yi P., Das D., Phyo A.P., Tarning J. et al.** (2009). Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *New England Journal of Medicine*. **361:**455-467.
- 19. **Dutta G.P., Puri S.K., Kamboj K.K., Srivastava S.K. et Kamboj V.P.** (1984). Interactions between oral contraceptives and malaria infections in rhesus monkeys. *Bulletin of the World Health Organization*. **62:**931-939.
- 20. Edstein M.D., Corcoran K.D., Shanks G.D., Ngampochjana M., Hansukjariya P., Sattabongkot J. et al. (1994). Evaluation of WR250417 (a proguanil analog) for causal prophylactic activity in the *Plasmodium cynomolgi-Macaca mulatta* model. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **50**:181-186.
- 21. **Euzéby J.** (2008). Grand dictionnaire illustré de parasitologie médicale et vétérinaire, édition n° 1. Édité par Tec & Doc Lavoisier, Paris. 815 pages.
- 22. **Fandeur T., Gysin J. et Mercereau-Puijalon O.** (1992). Protection of squirrel monkeys against virulent *Plasmodium falciparum* infections by use of attenuated parasites. *Infection and Immunity*. **60:**1390-1396.
- 23. **Fidock D.A., Rosenthal P.J., Croft S.L., Brun R. et Nwaka S.** (2004). Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening. *Nature Reviews. Drug discovery.* **3:**509-520.

- 24. **Flateau C., Le Loup G. et Pialoux G.** (2011). Consequences of HIV infection on malaria and therapeutic implications: a systematic review. *The Lancet Infectious Diseases.* **11:**541-556.
- 25. Flynn J.L., Capuano S.V., Croix D., Pawar S., Myers A., Zinovik A. et al. (2003). Non-human primates: a model for tuberculosis research. *Tuberculosis*. 83:116-118.
- 26. **Fujioka H., Millet P., Maeno Y., Nakazawa S., Ito Y., Howard R.J. et al.** (1994). A nonhuman primate model for human cerebral malaria: rhesus monkeys experimentally infected with *Plasmodium fragile*. *Experimental Parasitology*. **78:**371-376.
- 27. Garcia L.S. (2010). Malaria. Clinics in Laboratory Medecine. 30:93-129.
- 28. **Geiman Q.M. et Meagher M.J.** (1967). Susceptibility of a new world monkey to *Plasmodium falciparum* from man. *Nature*. **215**:437-439.
- 29. **Global Malaria Programme** (2010). World Malaria Report 2010. World Health Organization. WHO Press, Geneva, CH.
- 30. **Gysin J.** (1998). Animal models: Primates. *In Malaria: Parasite Biology, Pathogenesis and Protection*, édition n° 1. Édité par ASM Press, Washington, DC, USA. 419-441.
- 31. **Gysin J.** (1991). Relevance of the squirrel monkey as a model for experimental human malaria. *Research in Immunology.* **142**:649-654.
- 32. **Gysin J., Aikawa M., Tourneur N. et Tegoshi T.** (1992). Experimental *Plasmodium falciparum* cerebral malaria in the squirrel monkey *Saimiri sciureus*. *Experimental Parasitology*. **75:**390-398.
- 33. Han H., Chen Y., Bi H., Yu L., Sun C., Li S. et al. (2011). *In vivo* antimalarial activity of ginseng extracts. *Pharmaceutical Biology.* **49:**283-289.
- 34. **He Z., Chen L., You J., Qin L. et Chen X.** (2009). Antiretroviral protease inhibitors potentiate chloroquine antimalarial activity in malaria parasites by regulating intracellular glutathione metabolism. *Experimental Parasitology*. **123**:122-127.
- 35. Hobbs C.V., Voza T., Coppi A., Kirmse B., Marsh K., Borkowsky W. et al. (2009). HIV protease inhibitors inhibit the development of preerythrocytic-stage *Plasmodium* parasites. *Journal of Infectious Diseases*. **199:**134-141.
- 36. **Hsu D.Y.M. et Geiman Q.M.** (1952). Synergistic effect of *Haemobartonella muris* on *Plasmodium berghei* in white rats. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **1:**747-760.
- 37. **Hu S.-L.** (2005). Non-human primate models for AIDS vaccine research. *Current Drug Targets. Infectious Disorders.* **5**:193-201.

- 38. **Ignatova I.E. et Agrba V.Z.** (2010). Parameters of cellular immunity in primates. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. **149:**86-88.
- 39. **Ihaka R. et Gentleman R.** (1996). R: a language for a data analysis and graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics*. **5:**299-314.
- 40. **Ishihara C., Tsuji M., Hagiwara K., Hioki K., Arikawa J. et Azuma I.** (1994). Transfusion with xenogenic erythrocytes into SCID mice and their clearance from the circulation. *Journal of Veterinary Medical Science*. **56:**1149-1154.
- 41. **Jambou R., Legrand E., Niang M., Khim N., Lim P., Volney B.** *et al.* (2005). Resistance of *Plasmodium falciparum* field isolates to in-vitro artemether and point mutations of the SERCA-type PfATPase6. *The Lancet.* **366**:1960-1963.
- 42. **Jiménez-Díaz M.B., Mulet T., Viera S., Gomez V., Garuti H., Ibanez J. et al.** (2009). Improved murine model of malaria using *Plasmodium falciparum* competent strains and non-myelodepleted NOD-scid IL2R null mice engrafted with human erythrocytes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **53:**4533-4536.
- 43. **Jiménez-Díaz M.B., Rullas J., Mulet T., Fernández L., Bravo C., Gargallo-Viola D.** *et al.* (2005). Improvement of detection specificity of *Plasmodium*-infected murine erythrocytes by flow cytometry using autofluorescence and YOYO-1. *Cytometry. Part A.* **67**:27-36.
- 44. **Kaur A.** (2004). Bioimmunotherapy of rodent malaria: co-treatment with recombinant mouse granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and an enkephalin fragment peptide Tyr-Gly-Gly. *Acta Tropica*. **91:**27-41.
- 45. Kocken C.H.M., Remarque E.J., Dubbeld M.A., Wein S., van der Wel A., Verburgh R.J. et al. (2009). Statistical model to evaluate in vivo activities of antimalarial drugs in a *Plasmodium cynomolgi*-macaque model for *Plasmodium vivax* malaria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **53**:421-427.
- 46. **Koehler J.W., Bolton M., Rollins A., Snook K., de Haro E., Henson E.** *et al.* (2009). Altered immune responses in rhesus macaques co-infected with SIV and *Plasmodium cynomolgi*: an animal model for coincident AIDS and relapsing malaria. *PloS one.* **4:**e7139.
- 47. **Kotecka B.M., Barlin G.B., Edstein M.D. et Rieckmann K.H.** (1997). New quinoline di-Mannich base compounds with greater antimalarial activity than chloroquine, amodiaquine or pyronaridine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **41:**1369-1374.
- 48. **Kredo T., Mauff K., Van der Walt J.S., Wiesner L., Maartens G., Cohen K. et al.** (2011). The interaction between artemether-lumefantrine and nevirapine-based antiretroviral therapy in HIV-1 infected patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.*
- 49. **Kumaratilake L.M., Ferrante A., Jaeger T. et Rzepczyk C.** (1996). GM-CSF-induced priming of human neutrophils for enhanced phagocytosis and killing of

- asexual blood stages of *Plasmodium falciparum*: synergistic effects of GM-CSF and TNF. *Parasite Immunology*. **18:**115-123.
- 50. Le Scanf C., Vigan-Womas I., Contamin H., Guillotte M., Bischoff E. et Mercereau-Puijalon O. (2008). Rosetting is associated with increased *Plasmodium falciparum in vivo* multiplication rate in the *Saimiri sciureus* monkey. *Microbes and Infection*. **10**:447-451.
- 51. **LEEM** (Consulté le 18/10/2011). LEEM Les entreprises du médicament [en ligne]. Adresse: http://www.leem.org/
- 52. **Levinson G., Hugues A.L. et Letvin N.L.** (1992). Sequence and diversity of rhesus monkey T-cell receptor β chain genes. *Immunogenetics*. **35**:75-88.
- 53. Li Q., Gerena L., Xie L., Zhang J., Kyle D. et Milhous W. (2007). Development and validation of flow cytometric measurement for parasitemia in cultures of *P. falciparum* vitally stained with YOYO-1. *Cytometry. Part A.* 71:297-307.
- 54. Li X., He Z., Chen L., Li Y., Li Q., Zhao S. et al. (2011). Synergy of the antiretroviral protease inhibitor indinavir and chloroquine against malaria parasites in vitro and in vivo. Parasitology Research. 109:1519-1524.
- 55. Li Y., Qin L., Peng N., Liu G., Zhao S., He Z. et al. (2011). Antimalarial effects of human immunodeficiency virus protease inhibitors in rhesus macaques. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **55**:3039-3042.
- 56. Looareesuwan S., Oosterhuis B., Schilizzi B.M., Sollie F.A.E., Wilairatana P., Krudsood S. et al. (2002). Dose-finding and efficiency study for i.m. artemotil (beta-artheter) and comparison with i.m. artemether in acute uncomplicated *P. falciparum* malaria. *Journal of Clinical Pharmacology*. 53:492-500.
- 57. Maeno Y., Brown A.E., Smith C.D., Tegoshi T., Toyoshima T., Ockenhouse C.F. et al. (1993). A non-human primate model for human cerebral malaria: effects of artesunate (qinghaosu derivative) on rhesus monkeys experimentally infected with *Plasmodium coatneyi*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 49:726-734.
- 58. Margout D., Bontemps N., Kocken C.H.M., Vial H.J. et Bressolle F.M.M. (2009). Rapid resolution liquid chromatography-mass spectrometry determination of SAR97276 in monkey matrices. Pharmacokinetics in rhesus monkey infected by *Plasmodium cynomolgi*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **49:**1266-1271.
- 59. **Medicines for Malaria Venture** (Consulté le 18/09/2011). Medicines for Malaria Venture, MMV [en ligne]. Adresse: http://www.mmv.org/
- 60. Mercer D.F., Schiller D.E., Elliott J.F., Douglas D.N., Hao C., Rinfret A. et al. (2001). Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nature Medicine*. **7**:927-933.

- 61. **Moreno A., Badell E., Van Rooijen N. et Druilhe P.** (2001). Human malaria in immunocompromised mice: new *in vivo* model for chemotherapy studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **45**:1847-1853.
- 62. **Moreno A., Ferrer E., Arahuetes S., Eguiluz C., Rooijen N.V. et Benito A.** (2006). The course of infections and pathology in immunomodulated NOD/LtSz-SCID mice inoculated with *Plasmodium falciparum* laboratory lines and clinical isolates. *International Journal for Parasitology.* **36:**361-369.
- 63. **Moreno A., Pérignon J.L., Morosan S., Mazier D. et Benito A.** (2007). *Plasmodium falciparum*-infected mice: more than a tour de force. *Trends in Parasitology.* **23:**254-259.
- 64. Morosan S., Hez-Deroubaix S., Lunel F., Renia L., Giannini C., Van Rooijen N. et al. (2006). Liver-stage development of *Plasmodium falciparum*, in a humanized mouse model. *Journal of Infectious Diseases*. **193**:996-1004.
- 65. **Nájera J.A., González-Silva M. et Alonso P.L.** (2011). Some lessons for the future from the global malaria eradication programme (1955-1969). *PLoS Medicine*. **8:**e1000412-e1000412.
- 66. **National Research Council** (2011). Guide for the care and use of laboratory animals, édition n° 8. Édité par The National Academies Press, Washington, DC, USA. 220 pages.
- 67. Newton P.N., Chotivanich K., Chierakul W., Ruangveerayuth R., Teerapong P., Silamut K. et al. (2001). A comparison of the *in vivo* kinetics of *Plasmodium falciparum* ring-infected erythrocyte surface antigen-positive and -negative erythrocytes. *Blood.* 98:450-457.
- 68. **Noedl H., Se Y., Schaecher K., Smith B.L., Socheat D. et Fukuda M.M.** (2008). Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. *New England Journal of Medicine*. **359**:2619-2620.
- 69. **Noedl H., Wernsdorfer W.H., Miller R.S. et Wongsrichanalai C.** (2002). Histidine-rich protein II: a novel approach to malaria drug sensitivity testing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **46**:1658-1664.
- 70. **Onabanjo A.O. et Maegraith B.G.** (1970). Inflammatory changes in small blood vessels induced by kallikrein (kininogenase) in the blood of *Macaca mulatta* infected with *Plasmodium knowlesi*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. **64:**227-236.
- 71. Ott K.J., Astin J.K. et Stauber L.A. (1967). Eperythrozoon coccoides and rodent malaria: Plasmodium chabaudi and Plasmodium berghei. Experimental Parasitology. 21:68-77.
- 72. Parham P., Abi-Rached L., Matevosyan L., Moesta A.K., Norman P.J., Older Aguilar A.M. et al. (2010). Primate-specific regulation of natural killer cells. *Journal of Medical Primatology.* **39:**194-212.

- 73. Peatey C.L., Andrews K.T., Eickel N., MacDonald T., Butterworth A.S., Trenholme K.R. et al. (2010). Antimalarial asexual stage-specific and gametocytocidal activities of HIV protease inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **54:**1334-1337.
- 74. **Peters W.** (1980). Chemotherapy of malaria. édition n° 1. Édité par Academic Press, New York. 145-283.
- 75. Pitcher C.J., Hagen S.I., Walker J.M., Lum R., Mitchell B.L., Maino V.C. et al. (2002). Development and homeostasis of T cell memory in rhesus macaque. *Journal of Immunology.* **168:**29-43.
- 76. **Prasad R.N., Mahajan R.C. et Ganguly N.K.** (1987). Effect of chloroquine on cellular immune responses of normal and *P. knowlesi*-infected rhesus monkeys. *Immunology and Cell Biology.* **65:**211-216.
- 77. **Puri S.K. et Dutta G.P.** (1990). Causal prophylactic activity of a new 8-aminoquinoline derivative against *Plasmodium cynomolgi* B in rhesus monkeys. *Indian Journal of Medical Research*. **91:**197-199.
- 78. **Puri S.K. et Singh N.** (2000). Azithromycin: antimalarial profile against bloodand sporozoite-induced infections in mice and monkeys. *Experimental Parasitology.* **94:**8-14.
- 79. **Raether W. et Fink E.** (1979). Antimalarial activity of Floxacrine (HOE 991) I. Studies on blood schizontocidal action of Floxacrine against *Plasmodium berghei*, *P. vinckei* and *P. cynomolgi. Annals of Tropical Medicine and Parasitology.* **73:**505-526.
- 80. **Ralph S.** (2001). The apicoplast as an antimalarial drug target. *Drug Resistance Updates*. **4:**145-151.
- 81. **Rich S.M. et Ayala F.J.** (2003). Progress in malaria research: the case for phylogenetics. *Advances in Parasitology*. **54:**255-280.
- 82. **Rosenthal P.J., Sijwali P.S., Singh A. et Shenai B.R.** (2002). Cysteine proteases of malaria parasites: targets for chemotherapy. *Current Pharmaceutical Design.* **8:**1659-1672.
- 83. **Rotella D.P.** (2002). Osteoporosis: challenges and new opportunities for therapy. *Current Opinion in Drug Discovery and Development.* **5**:477-486.
- 84. Sacci J.B., Alam U., Douglas D., Lewis J., Tyrrell D.L., Azad A.F. et al. (2006). *Plasmodium falciparum* infection and exoerythrocytic development in mice with chimeric human livers. *International Journal of Parasitology.* **36:**353-360.
- 85. Sacci J.B., Schriefer M.E., Resau J.H., Wirtz R.A., Detolla L.J., Markham R.B. et al. (1992). Mouse model for exoerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum* malaria parasite. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 89:3701-3705.

- 86. **Sanni L.A., Fonseca L.F. et Langhorne J.** (2002). Mouse models for erythrocytic-stage malaria. *In Malaria Methods and Protocols*, édition n° 1. Édité par Humana Press, Inc., Totowa, NJ, USA. 57-76.
- 87. **Service M.W.** (2001). The encyclopedia of arthropod-transmitted infections, édition n° 1. Édité par CABI Publishing, New York, NY, USA. 580 pages.
- 88. **Sharma P., Husain M. et Dutta G.P.** (1984). Changes in concentration of lymphocytes subpopulations in rhesus monkey during *Plasmodium knowlesi* infection and in drug-cured immune monkeys. *Indian Journal of Malariology*. **21:**31-36.
- 89. **Sherman I.W.** (1998). Malaria : Parasite Biology, Pathogenesis and Protection, édition n° 1. Édité par ASM Press, Washington, DC, USA. 590 pages.
- 90. **Shi Y.-L., Li G.F., Zhao J.H., Yang J.D. et Ding D.B.** (1999). Schizontocidal effects of oral artesunate on *Plasmodium berghei* in mice and *P. knowlesi* in monkeys. *Acta Pharmacologica Sinica*. **20:**755-758.
- 91. Singh B., Kim Sung L., Matusop A., Radhakrishnan A., Shamsul S.S.G., Cox-Singh J. et al. (2004). A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *The Lancet*. **363**:1017-1024.
- 92. **Singh P.P. et Singh S.** (2001). Protection of mice from malaria after co-administration of recombinant mouse granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and methionine-enkephalin. *European Cytokine Network*. **12:**528-536.
- 93. Thorsten U.V., Evans D.T., Urvater J.A., O'Connor D.H., Hugues A.L. et Watkins D.I. (1999). Major histocompatibility complex class I genes in primates: co-evolution with pathogens. *Immunology Reviews.* **167**:327-337.
- 94. **Trager W. et Jensen J.B.** (1976). Human malaria parasites in continuous culture. *Science.* **193:**673-675.
- 95. **Trigg P.I. et Kondrachine A.V.** (1998). Commentary: malaria control in the 1990s. *Bulletin of the World Health Organization*. **76:**11-16.
- 96. **Tripathi R., Vishwakarma R.a. et Dutta G.P.** (1997). *Plasmodium fragile*: efficacy of arteether (alpha/beta) against cerebral malaria model. *Experimental Parasitology.* **87:**290-292.
- 97. **Trivedi B.** (2010). The primate connection. *Nature.* **466:**S5.
- 98. Trott K.A., Chau J.Y., Hudgens M.G., Fine J., Mfalila C.K., Tarara R.P. et al. (2011). Evidence for an increased risk of SIV and malaria transmission in a rhesus macaque co-infection model. *Journal of Virology*. **85**:11655-11663.
- 99. **Tsuji M., Ishihara C., Arai S., Hiratai R. et Azuma I.** (1995). Establishment of a SCID mouse model having circulating human red blood cells and a possible growth of *Plasmodium falciparum* in the mouse. *Vaccine*. **13:**1389-1392.

- 100. **van Veldhuizen C.** (2011). Communication personnelle.
- 101. Vigan-Womas I., Guillotte M., Le Scanf C., Igonet S., Petres S., Juillerat A. et al. (2008). An in vivo and in vitro model of Plasmodium falciparum rosetting and autoagglutination mediated by varO, a group A var gene encoding a frequent serotype. Infection and Immunity. **76:**5565-5580.
- 102. **Vincke I.H., Bafort J. et Scheepers-Biva M.** (1966). Observations récentes sur la transmission cyclique du *Plasmodium berghei. Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale.* **46:**327-336.
- 103. Waki S., Kurihara R., Nemoto H. et Suzuki M. (1993). Effect of recombinant human colony-stimulating factor on the course of parasitaemia in non-lethal rodent malaria. *Parasitology Research*. **79:**703-705.
- 104. **Wierda D., Smith H.W. et Zwickl C.M.** (2001). Immunogenicity of biopharmaceuticals in laboratory animals. *Toxicology.* **158:**71-74.
- 105. **Wikipédia** (Consulté le 19/10/2011). Wikipédia [en ligne]. Adresse: http://fr.wikipedia.org/
- 106. **World Health Organization** (1988). Role of non-human primates in malaria vaccine development: Memorandum from a WHO Meeting. *Bulletin of the World Health Organization*. **66:**719-728.
- 107. **Xie L., Li Q., Johnson J., Zhang J., Milhous W. et Kyle D.** (2007). Development and validation of flow cytometric measurement for parasitaemia using autofluorescence and YOYO-1 in rodent malaria. *Parasitology*. **134:**1151-1162.
- 108. **Yeo A.E.** (1997). Direct comparison of antimalarial activity among PS-15 combination therapies by bioassay of serum samples from treated *Saimiri sciureus. Journal of Parasitology.* **83:**515-518.
- 109. **Young M.D., Porter J.A. et Johnson C.M.** (1966). *Plasmodium vivax* transmitted from man to monkey to man. *Science*. **153**:1006-1007.

Annexe 1 : Références et fournisseurs des réactifs et produits chimiques

Produit	Référence	Fournisseur	Siège
Amoxicilline	Clamoxyl suspension	Pfizer Santé Animale	Paris, France
Buprénorphine	Buprécare	Axience	Pantin, France
Chlorure de sodium	S7653	Sigma-Aldrich	Saint Louis, MO, USA
DMSO	D8418	Sigma-Aldrich	Saint Louis, MO, USA
DPBS	14190	Invitrogen	Carlsbad, CA, USA
Éthanol absolu	83813	VWR	Fontenay-sous-Bois, France
Gentamycine	G1397	Sigma-Aldrich	Saint Louis, MO, USA
Giemsa	320310	Réactifs RAL	Martillac, France
Glutaraldéhyde	G5882	Sigma-Aldrich	Saint Louis, MO, USA
Hypoxanthine	Z-41-M	C.C.Pro	Oberdola, Allemagne
Hypoxanthine tritiée	NET177005MC	PerkinElmer	Waltham, MA, USA
Kétamine	Kétamine 1000	Virbac	Carros, France
Kétoprofène	Ketofen 10%	Mérial	Villeurbanne, France
Midazolam	Midazolam	Aguettant	Lyon, France
Quinine	Q1125	Sigma-Aldrich	Saint Louis, MO, USA
RNase A/T1 mix	EN0551	Fermentas	Villebon sur Yvette, France
RPMI 1640 1X avec L-glutamine et HEPES	52400	Invitrogen	Carlsbad, CA, USA
Tampon pH 7,2 pour coloration Giemsa	109468	Merck	Darmstadt, Allemagne
Triton X100	X100RS	Sigma-Aldrich	Saint Louis, MO, USA
Tween 80	P1754	Sigma-Aldrich	Saint Louis, MO, USA
YOYO-1	Y3601	Invitrogen	Carlsbad, CA, USA
B-artééther	Artecef 50	ACE pharmaceuticals	Zeewolde, Pays-Bas

Annexe 2 : Composition du milieu RPMI 1640

Adapté de Moore et al. [49]

Composants	Poids moléculaire	Concentration	Concentration	
Composants	(g/mol)	(mg/L)	(mM)	
Acides aminés	(9/11101)			
Glycine	75	10	0,133	
L-arginine	174	200	1,15	
L-asparagine	132	50	0,379	
Acide L-aspartique	133	20	0,15	
L-cystine	240	20	0,0833	
Acide L-glutamique	147	20	0,136	
L-glutamine	146	300	2,05	
L-histidine	155	15	0,0968	
L-hydroxyproline	131	20	0,153	
L-isoleucine	131	50	0,382	
L-leucine	131	50	0,382	
Chlorhydrate de L-lysine	146	40	0,274	
L-méthionine	149	15	0,101	
L-phénylalanine	165	15	0,0909	
L-proline	115	20	0,174	
L-sérine	105	30	0,286	
L-thréonine	119	20	0,168	
L-tryptophane	204	5	0,0245	
L-tyrosine	181	20	0,11	
L-valine	117	20	0,171	
Vitamines			·	
Biotine (vitamine B8)	244	0,2	0,00082	
Chlorure de choline (B4)	140	3	0,0214	
D-pantothénate de calcium (B5)	477	0,25	0,000524	
Acide folique (B9)	441	1	0,00227	
Nicotinamide (B3)	122	1	0,0082	
Acide para-aminobenzoïque (B10)	137	1	0,0073	
Chlorhydrate de pyridoxine (B6)	206	1	0,00485	
Riboflavine (B2)	376	0,2	0,000532	
Chlorhydrate de thiamine (B1)	337	1	0,00297	
B12	1355	0,005	0,0000037	
I-inositol (B7)	180	35	0,194	
Sels inorganiques				
Nitrate de calcium (Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O)	236	100	0,424	
Sulfate de magnésium (MgSO ₄ 7H ₂ O)	246	100	0,407	
Chlorure de potassium (KCI)	75	400	5,33	
Bicarbonate de sodium (NaHCO ₃)	84	2000	23,81	
Chlorure de sodium (NaCl)	58	5500	94,83	

Phosphate de sodium dibasique (Na ₂ HPO ₄) anhydre	142	800	5,63		
Autres composants					
D-glucose (Dextrose)	180	2000	11,11		
Glutathion (réduit)	307	1	0,00326		
HEPES	238	5958	25,03		
Rouge phénol	376,4	5	0,0133		

Annexe 3 : Dilutions des molécules pour le test de Desjardins

Plaque 1

Plaque 2

	1	2	3	4	2	9	7	8	6	10	11	12
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
89	0,01	0,01	0,34	0,34	0,14	0,14	0,04	0,04	0000'0	0000	000'0	0,000
U	0,04	0,04	1,03	1,03	0,41	0,41	0,12	0,12	0000'0	0000	0,001	0,001
0	0,12	0,12	3,09	3,09	1,23	1,23	0,37	0,37	0,001	0,001	0,002	0,002
ш	0,37	0,37	9,26	9'56	3,70	3,70	1,11	1,11	0,002	0,002	900′0	900'0
ш	1,11	1,11	27,78	27,78	11,11	11,11	86,8	3,33	200'0	0,005	0,018	0,018
ŋ	3,33	3,33	83,33	83,33	33,33	33,33	10	10	0,015	0,015	920'0	0,055
I	10	10	250	250	100	100	30	30	0,046	0,046	0,165	0,165
	DHA (nM)	(nM)	MQ (nM)	(Mn)	mAQ (nM)	(nM)	AS (nM)	ıMı)	Méthanol (%)	(%) Jou	H2O (%)	(%)

			Р	lac	lue	2			
12	0	0,001	0,002	900'0	0,019	950'0	0,167	0,500	DMSO (%)
11	0	0,001	0,002	900'0	0,019	950'0	0,167	0,500	DMS
10	0	000'0	0,001	0,003	600'0	0,026	6/0′0	0,238	(%) lo
6	0	000'0	0,001	0,003	600'0	0,026	6/0′0	0,238	Ethanol (%)
8	0	69	206	617	1852	5556	16667	20000	(Mu)
7	0	69	506	617	1852	5556	16667	20000	(D3 (nM)
9	0	1,37	4,1	12	37	111	333	1000	(Mr
5	0	1,37	4,1	12	37	111	333	1000	(nM)
4	0	9	18	54	162	486	1458	4373	Mn)
3	0	9	18	54	162	486	1458	4373	QU (nM
2	0	2	9	19	95	167	200	1500	nM)
1	0	2	9	19	95	167	200	1500	CQ (nM)
	А	æ	U	۵	ш	u.	ŋ	Ξ	

Légende

DHA : dihydroartémisinine ; MQ : méfloquine ; mAQ : monodéséthylamodiaquine ; AS : artésunate ; CQ : chloroquine ; QU : quinine ; LU : luméfantrine.

GRANDIN CLÉMENT:

Les modèles pour l'évaluation *in vivo* des molécules antipaludiques. Développement d'un test d'efficacité chez le singe écureuil (*Saimiri sciureus*).

Thèse d'État de Doctorat Vétérinaire : Lyon, le 09/12/2011

RÉSUMÉ:

En l'absence de vaccin, les molécules antipaludiques sont la base de la lutte contre le paludisme. Or toutes les familles de molécules antipaludiques sont confrontées à l'apparition de résistance des parasites. Il est donc important de développer de nouvelles familles de médicaments. Après une introduction aux bases biologiques, cliniques et épidémiologiques du paludisme, ainsi qu'au mode de développement contemporain des nouveaux médicaments, cette thèse présente les différents modèles animaux permettant d'évaluer l'efficacité des molécules antipaludiques.

La seconde partie de cette thèse expose le développement d'un test d'efficacité chez le singe écureuil (Saimiri sciureus) infecté par Plasmodium falciparum. Ce primate d'Amérique du Sud est l'une des seules espèces sensibles au parasite humain. L'infection des animaux a été reproduite de manière standardisée. Un traitement de référence (le β-artééther) a été évalué et validé en tant que contrôle positif. Une méthode d'évaluation de la parasitémie des animaux par cytométrie de flux, utilisant le marqueur YOYO-1, a été adaptée de la souris au singe écureuil. Elle permet une estimation fiable, précise et rapide de la parasitémie. Enfin, une étude préliminaire a été menée sur une molécule en cours de développement à l'Unité d'Immunologie Moléculaire des Parasites de l'Institut Pasteur.

Le modèle de singe écureuil infecté par *P. falciparum* apparaît fiable et opérationnel pour l'évaluation de l'effet antipaludique de candidats médicaments.

MOTS CLÉS: - Saïmiris

- Paludisme

- Plasmodium falciparum

AntipaludiquesCytométrie de flux

JURY:

Président : Monsieur le Professeur Stéphane Picot

1er Assesseur :Monsieur le Professeur Gilles Bourdoiseau2ème Assesseur :Monsieur le Professeur Philippe BernyMembre invité :Monsieur le Docteur Jean-Christophe BaraleMembre invité :Monsieur le Docteur Hugues Contamin

DATE DE SOUTENANCE : vendredi 9 décembre 2011

ADRESSE DE L'AUTEUR : 8 rue du Colombier

14 920 Mathieu