

GLOSSAIRE

3D7	Souche chloroquino-sensible de <i>Plasmodium falciparum</i>
A	Adénine
ACT	Artemisinin-based Combination Therapy
AND	Acide DésoxyriboNucléique
An	<i>Anopheles</i>
ANAMED	Action for Nature and Medicine
ARN	Acide RiboNucléique
C	Cytosine
°C	Degrés Celsius
CDC	Central of Disease Control
CINB	Code International de Nomenclature Botanique
CI ₅₀	Concentration minimale inhibitrice
CQR	Chloroquino-Résistant
CSP	Cercum Sporozoite Protein
DAPI	DiAmidino Phenyl Indol
DDT	Dichloro-Diphényl-Trichloroétane
DELI detection	Double-site Enzyme-linked Lactate dehydrogenase enzyme Immuno-detection
DHA	Dihydroartémisinine
DP	Densité Parasitaire
EDTA	Ethylène Diamine Tétra Acétate
ELISA	Enzym Linked ImmunoSorbent Assay
GE	Goutte épaisse
HRP-2	Histidin Rich Protein-2
IFBV	Iwerliemen Fer Bredeete Volleker

IP	Indice Plasmodique
J.C	Jesus Christ
Kb	Kilo base
LDH	Lactate Deshydrogenase
LIBS	Laser-Induced Breakdown Spectrometer
MI	Moustiquaire Imprégnée
OCCGE Grandes	Organisation de Coordination et de Coopération pour la lute contre les Endémies
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ONG	Organisation Non Gouvernementale
OUA	Organisation de l'Unité Africaine
PCR	Polymeras Chain of Reaction
<i>Pf</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>PfDHFR</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> dihydrofolate reductase
<i>PfDHPS</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> dihydropteroate synthase
PIH	Piqures Infectées par Homme
PNLP	Programme National de Lutte contre le Paludisme
QBC	Quantitative Buffy Coat
TIE	Taux d'Inoculation Entomologique
µg	Microgramme
µm	Micromètre
µl	Microlitre
W2	Souche chloroquino-résistante de <i>P. falciparum</i>

FIGURES ET TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Coupe transversale de <i>Plasmodium falciparum</i> et des ultrastructures de la cellule	9
Figure 2 : Cycle de développement de <i>Plasmodium falciparum</i>	14
Figure 3 : La répartition des principaux vecteurs du paludisme du Sénégal	16
Figure 4: Introduction des antipaludiques et apparition des résistances (R) de <i>Plasmodium falciparum</i>	29
Figure 5 : La plante d' <i>Artemisia annua</i>	51
Figure 6 : La structure chimique de l'artémisinine	59
Figure 7 : La structure chimique de l'artésunate.....	61
Figure 8 : La structure chimique de l'artéméther.....	61
Figure 9 : La structure chimique de l'artééther.....	61
Figure 10 : La structure chimique du dihydroartémisinine.....	62
Figure 11 : Structure chimique d'une molécule de Flavonoïde	70
Figure 12 : Découpage administratif de la région de Dakar	80
Figure 13 : La carte de la région de Thiès	82
Figure 14 : Dilution des plaques de culture pour le DELI-test	89
Figure 15 : Plaque saturée recouverte d'aluminium.....	90
Figure 16 : Une photo de spectrophotomètre.....	91
Figure 17 : Dilution des plaques de culture pour le DAPI-test.....	92
Figure 18 : Structure chimique du DAPI	92
Figure 19 : Fixation du DAPI sur l'ADN et action de la lumière ultraviolette	93
Figure 20 : Absorption des radiations violettes	93
Figure 21 : Préparation et lecture des plaques après 48 heures	95
Figure 22 : Schéma d'un plasma créé à la surface d'une cible solide.....	96
Figure 23 : Dispositif du LIBS avec éléments non branchés.....	97
Figure 24 : Spectres d'émission des éléments	97

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Critères de diagnostic du paludisme grave ou complique.....	21
Tableau II : Méthodes d'évaluation <i>in vitro</i> des plantes médicinales (Sauvin, 2002)	48
Tableau III : Méthodes d'évaluation <i>in vitro</i> des plantes médicinales (Malebo, 2009).....	49
Tableau IV: Résultats d'extraction (Mueller et al, 2000)	55
Tableau V : Résultats d'extraction (Räth et al, 2004)	56

SOMMAIRE

Introduction	1
Chapitre I : Généralités sur le paludisme et les plantes médicinales	6
Première partie : Généralités sur le paludisme	7
I-Epidémiologie	8
I-1 Classification de l'agent pathogène	8
I-2 Ultrastructure du merozoite.....	9
I-3 Gérome de <i>Plasmodium falciparum</i>	10
I-3-1 Structure et composition	10
I-3-2 Structure des chromosomes de <i>Plasmodium falciparum</i>	11
I-4 Cycle de développement des plasmodiums humains.....	11
I-4-1 Cycle chez l'homme.....	12
I-4-1-1 Cycle exo-érythrocytaire	12
I-4-1-2 Cycle intra érythrocytaire	12
I-4-2 Chez l'anophèle	13
I-5 Mode de transmission du paludisme	15
I-5-1 Les vecteurs du paludisme	15
I-5-2 Type de transmission.....	17
I-5-3 Faciès épidémiologique	17
I-5-4 Mode de contamination	18
I-5-5 Les facteurs favorisant la transmission	18
II-Manifestations cliniques	19
II-1 Les accès palustres simples	19
II-2 Les accès pernicieux ou accès graves	20
III-Immunité anti palustre	22
IV-Diagnostic du paludisme	22
IV-1 Diagnostic clinique	22

IV-2 Diagnostic biologique	23
IV-2-1 Méthodes directes.....	23
IV-2-1-1 Le frottis mince et la goutte épaisse	23
IV-2-1-2 La Polymerase Chain Reaction (PCR)	24
IV-2-1-3 Le QBC ou le « Quantitative Buffy Coat ».....	24
IV-2-2 Méthodes indirectes : les tests de diagnostic rapides	25
V-Traitement du paludisme	25
V-1 Les cibles plasmodiales	25
V-2 Les molécules antipaludiques	26
V-2-1 Les schizonticides	26
V-2-2 Les inhibiteurs des acides nucléiques ou antimétaboliques	26
V-2-3 Les associations d'antipaludiques	27
V-2-4 Les gamétocytocides	27
V-3 Les molécules antipaludiques issues des plantes médicinales.....	27
VI-Lutte anti vectorielle	28
VII-Résistance de <i>Plasmodium falciparum</i> aux antipaludiques et contexte actuel.....	29
VII-1 Aperçu général de la résistance	29
VII-2 Facteur d'apparition et d'extension	31
VIII-Résistance des vecteurs aux insecticides	32
VIII-1 La résistance métabolique	32
VIII-2 La résistance par modification de la cible	32
VIII-3 La résistance comportementale	33
IX-Méthodes d'évaluation de la chimiorésistance de <i>Plasmodium falciparum</i>	33
IX-1 Les tests <i>in vivo</i>	33
IX-2 Les tests <i>in vitro</i>	35
IX-2-1 Les anciennes méthodes	35

IX-2-1-1 Le Macrotest de Rieckmann	35
IX-2-1-2 Le Macrotest OMS	35
IX-2-2 Les nouvelles méthodes	36
IX-2-2-1 Les méthodes microscopiques	36
IX-2-2-2 Les méthodes isotopiques	38
IX-3 Les tests moléculaires	39
Deuxième partie : Généralités sur les plantes médicinales	40
I-Background sur les plantes médicinales	41
I-1 Historiques des plantes médicinales.....	41
I-2 Contribution de la médecine traditionnelle sur le développement de la médecine moderne	43
II- <i>L'Artemisia annua</i>	44
II-1 L'ethnopharmacologie	44
II-2 Activité antipaludique de <i>l'A. annua</i>	45
II-3 Recommandations de traitement.....	49
II-4 Aspect botanique.....	51
II-5 Culture de <i>l'Artemisia annua</i>	52
II-6 Préparation de la tisane d' <i>Artemisia annua</i>	55
II-6-1 Méthode de Mueller et al, 2000	55
II-6-2 Méthode de Rath et al, 2004	56
II-7 Composantes de <i>l'Artemisia annua</i> : propriétés et importances	57
II-7-1 Les terpénoides.....	57
II-7-1-1 Les monoterpènes : le camphre	58
II-7-1-2 Les sesquiterpènes : l'artémisinine	59
II-7-2 Les composés phénoliques : les flavonoïdes.....	69
II-7-3 Les éléments minéraux	72
II-7-4 Les protéines végétales	75
II-8 Pharmacocinétique et pharmacodynamique de la tisane d' <i>A.annua</i>	76
Chapitre II : Matériels et méthodes.....	79
I- Cadres de l'étude.....	80
I-1 Le Poste de Santé Touba Diacksao.....	80
I-2 Le Service de Lutte Antiparasitaire de Thiès	82

I-3 Les Laboratoires.....	84
II-Matériels d'étude.....	84
II-1 Matériel biologique	84
II-2 Matériels et réactifs de laboratoire.....	85
II-2-1 Matériels de laboratoire	85
II-2-2 Réactifs de laboratoire	86
III-Méthodologie.....	86
III-1 Critères d'inclusion et d'exclusion	86
III-2 Procédures de consentement	87
III-3 Détermination de la parasitémie	87
III-4 Prélèvements sanguins	87
III-5 Les différentes méthodes	88
III-5-1 Le DELI-test	88
III-5-2 Le DAPI-test	91
III-5-3 Le LIBS	95
Chapitre III : Résumés et discussion des articles	98
Conclusions et perspective...	142
Références bibliographiques.....	146

Le paludisme constitue l'une des maladies parasitaires les plus importantes dans le monde. Il est causé par une infection due aux parasites protozoaires du genre *Plasmodium*. Cette parasitose est due au développement et à la multiplication, d'abord dans les hépatocytes, puis dans les hématies, de cinq espèces de sporozoaires qui sont *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* et *P. knowlesi*. Parmi ces cinq espèces plasmodiales, *P. falciparum* est la plus pathogène. Cette espèce est responsable des formes sévères de la maladie avec des complications rénales, pulmonaires, cérébrales et hématologiques (anémies sévères). Cette maladie est transmise à l'homme par la piqûre de moustique femelle du genre *Anopheles* (**Touré et al, 2004**) à l'occasion d'un repas sanguin indispensable à la maturation des œufs.

Le rapport publié en 2011 par l'Organisation Mondiale de la Santé, montre que les taux de mortalité attribuables au paludisme, ont baissé depuis 2000, de plus de 25% au niveau mondial et de 33% dans le continent africain (**OMS, 2011**). Cependant, malgré cette baisse le paludisme demeure toujours un problème de santé publique dans le monde et plus particulièrement en Afrique Subsaharienne. Les estimations font état de 219 millions d'épisodes palustres dans le monde dont 80% dans la région Africaine, soit 175 millions de cas (**OMS, 2012**). Le nombre des décès dû au paludisme est estimé à 660 000 personnes dont 90% en Afrique (**OMS, 2012**). Une grande majorité de ces décès survient chez les jeunes enfants en Afrique notamment dans les zones rurales reculées très mal desservies en service de santé. A l'échelle mondiale, 86% des victimes du paludisme sont des enfants de moins de cinq ans (**OMS, 2011**). Les études ont montré que les enfants de moins de cinq ans et les femmes enceintes sont les groupes les plus vulnérables (**Abdullah et al, 2007 ; Brooker et al, 2007 ; Menendez et al, 2007**). Les femmes enceintes infectées sont souvent asymptomatiques mais la parasitémie peut causer des anémies maternelles et diminuer le poids de l'enfant à la naissance (**Dellicour et al, 2007**). Les autres groupes à haut risque sont les voyageurs non immunisés, les réfugiés, les personnes déplacées et les ouvriers agricoles arrivant dans des zones d'endémie.

Au Sénégal, le paludisme occupe une place de choix dans le cadre de la lutte contre la maladie. En effet, le Sénégal a mis en place dès 1995 un Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) et a élaboré trois plans quinquennaux stratégiques 1996-2000, 2001-2005 et 2005-2010. Différentes interventions de lutte sont mises en place depuis quelques années avec l'introduction des TPIp (Traitement Préventif Intermittent) en 2003, les ACT

(Combinaisons à base d'Artémisinine) en 2005, les TDR (Tests de Diagnostic Rapide) en 2008, la couverture universelle en moustiquaires imprégnées en Mars-Avril 2013, et tout récemment en octobre 2013, la chimoprévention saisonnière du paludisme chez les enfants âgés de moins de 10 ans. Ainsi, la mise en œuvre de ces plans stratégiques a permis de réduire de façon significative la morbidité et la mortalité liées au paludisme. Malgré cette réduction, le paludisme demeure toujours un problème de santé publique au Sénégal. Le taux de morbidité proportionnelle est passé de 35,72% des cas cliniques en 2001 à 3,07% des cas confirmés en 2009 (**PNLP, 2010**). Dans la même période, la mortalité proportionnelle est passée de 29,72% à 4,41% (**PNLP, 2010**).

Par ailleurs le paludisme freine le développement socio-économique (**Sachs et al, 2002**) en causant une baisse de la productivité des populations, en entraînant des décès prématurés, des pertes financières liées aux coûts des traitements médicaux. Les financements internationaux débloqués pour lutter contre le paludisme n'ont cessé d'augmenter pour culminer à 2 milliards de dollars US en 2011 (**OMS, 2011**). Bien que conséquentes, les sommes affectées sont encore bien en deçà des ressources nécessaires à l'atteinte des cibles définies en matière de lutte antipaludique, lesquelles sont estimées à plus de 5 milliards de dollars US par an pour la période 2010–2015 (**OMS, 2011**).

Parmi les grands problèmes sanitaires affectant les enfants scolarisés, le paludisme constitue une cause majeure de morbidité et de mortalité (**Bundy et al, 2006**). Sur le domaine éducatif, le paludisme a des conséquences graves sur les apprentissages et sur les résultats scolaires car il entrave aussi la scolarité des enfants en augmentant le taux d'absentéisme scolaire, surtout chez les enfants des zones rurales. Il affecte surtout les enfants d'âge scolaire qui vont de plus en plus constituer une frange présentant d'importants risques cliniques. Donc le paludisme est considéré comme une maladie de la pauvreté mais aussi une cause de pauvreté (**Mboera et al, 2007**). En effet, il existe une corrélation saisissante entre paludisme et pauvreté si l'on considère le niveau de revenu par tête d'habitant à travers le monde. La majeure partie des cas de décès surviennent en Afrique subsaharienne et sont causés en général par l'inaccessibilité aux médicaments antipaludiques (**Breman et al, 2004**). Au Sénégal, on estime que près de 18% de perte du pouvoir d'achat est causé par le paludisme (**Sachs et al, 2002**).

De ce fait la morbidité et la mortalité palustres persistantes sont dues, d'une part aux changements climatiques mondiaux, aux dégradations des services sanitaires, aux conflits armés et aux déplacements massifs des populations. Le développement explosif du tourisme

international favorise aussi l'importation du paludisme dans les pays développés. D'autre part, l'adaptation des parasites aux conditions de l'environnement, l'apparition de formes parasitaires multi résistantes et de moustiques résistants aux insecticides, constituent aussi des facteurs aggravants du paludisme dans le monde.

Ainsi les mesures qui ont été mises en place pour éliminer ce parasite, on peut citer les stratégies anti vectorielles et les traitements qui consistent en l'utilisation de médicaments antipaludiques. Les traitements antipaludiques consistaient tout au début en l'utilisation de poudres de plantes médicinales. Ce mode de traitement persiste toujours à côté des molécules antipaludiques qui sont recommandées par l'OMS et le comité scientifique mondial.

Il faut noter que les plantes médicinales sont utilisées dans le traitement de la malaria et des autres maladies bien avant Jésus Christ (**Willcox et al, 2004**). Plus de 1200 espèces végétales sont utilisées partout dans le monde pour traiter la malaria et plus de 75% des patients dans le monde ont choisi la médecine traditionnelle pour lutter contre le paludisme (**Willcox et al, 2004**). La médecine traditionnelle reste très répandue dans toutes les régions du monde en développement et son usage ne cesse de croître dans les pays industrialisés. D'ailleurs on ne peut pas parler de santé en Afrique sans parler des plantes médicinales. La phytothérapie occupe, en effet, une place très importante dans les soins de santé particulièrement en milieu rural. Chaque communauté possède, plus ou moins, sa propre pharmacopée. *L'Artemisia annua*, employée avec succès depuis plus de 2000 ans en Chine dans le traitement des fièvres en général et du paludisme en particulier, s'est révélée être une plante médicinale efficace. En plus de l'artémisinine, l'*A. annua* contient un grand nombre de substances. C'est une plante peu exigeante, peu encombrante qui peut être cultivée presque dans toutes les latitudes et toutes les régions du monde. Elle est utilisée par les populations locales de plusieurs pays dans le traitement de la malaria (**Willcox et al, 2004**).

Les molécules antipaludiques, sont aussi utilisées pour le traitement de la malaria. Elles avaient servi à combattre l'infection pendant plusieurs décennies mais au fil des années leurs efficacités ont été déjouées par le parasite créant ainsi des résistances. Au Sénégal, on est passé par plusieurs antipaludiques de synthèses. La chloroquine a été depuis longtemps le traitement de première intention contre les accès palustres simples. Mais son usage incontrôlé et banalisé, a contribué à l'émergence et à la propagation rapide d'une résistance parasitaire à la chloroquine (**Talisuna et al, 2007**). Le Sulfadoxine-pyriméthamine (SP ou Fansidar) a été introduit à grande échelle en remplacement à la chloroquine. Mais l'optimisme a été de

courte durée car en l'espace de quelques années seulement, une résistance à la SP a été observée. Suite aux recommandations de l'OMS, une nouvelle combinaison à base d'artémisinine est mise en œuvre depuis 2006. L'artémisinine, extrait d'une variété d'armoise, *A. annua* ou *ghinghaosu*, est à l'origine d'une nouvelle classe de molécule à grande efficacité antipaludique et qui a influencé la lutte contre la malaria (**Sriram et al, 2004 ; Haynes, 2006 ; Hsu, 2006, Bosman et Mendis, 2007**). L'artémisinine, ou ses dérivés, a entraîné une disparition de la fièvre et de la parasitémie plus rapidement que tout autre antipaludique connu (chez 90% des malades la parasitémie disparaît dans les 48 heures), et a provoqué que peu d'effets secondaires. Cependant les dérivés de l'artémisinine ne devraient jamais être pris en monothérapie mais toujours en association avec un autre antipaludique sous forme de traitement à base d'artémisinine (ACT). Les ACT sont considérés aujourd'hui comme le meilleur traitement contre le paludisme simple (**Olumnese, 2006**). Cette combinaison à base d'artémisinine est préconisée par l'OMS comme traitement de première intention contre les accès palustres simples (**OMS, 2010**). Néanmoins des cas de résistance aux ACT ont été notés dans le monde (**Noedl et al, 2008 ; Dondorp et al, 2009**). Donc, le contrôle effectif du paludisme nécessiterait plusieurs approches combinées dont le contrôle et la maîtrise du vecteur et l'utilisation de traitement antipaludique efficace et accessible (**Olumnese, 2006**). *A. annua*, plante ubiquiste et qui s'est révélée être un antipaludique efficace, peut être une autre alternative de traitement contre le paludisme surtout dans les coins les plus reculés et mal desservis en système de santé. Sous forme de tisane, l'*A. annua* contient un grand nombre d'autres substances (flavonoïdes, polyphénols, camphre, scopoletine, eupatine...) qui isolément ont également un effet sur le plasmodium et peuvent agir en synergie avec l'artémisinine. Ce qui exclut toute idée d'une monothérapie qui va à l'encontre des recommandations de l'OMS. Plusieurs études ont montré que sous forme de tisane, cette plante d'*A. annua*, est très efficace contre la malaria (**Willcox et al, 2004**).

C'est dans ce contexte que nous avons entrepris des études à Pikine et à Thiès concernant « la chimiosensibilité *ex vivo* des souches de *P. falciparum* à la tisane d'*A. annua* ». L'objectif général de ce travail consiste à étudier la sensibilité des souches de *P. falciparum* à la tisane d'*A. annua*. Cet objectif général est décliné et divisé en deux objectifs spécifiques que sont :

- Etudier la chimiosensibilité *ex vivo* des souches de *P. falciparum* à la tisane d'*A. annua* par les techniques de DELI-test (Double-site Enzyme-linked Lactate dehydrogenase enzyme Immuno-detection) et DAPI-test (DiAmidino Phenyl Indol)

- Caractériser les éléments minéraux contenus dans les feuilles de l'*A. annua* par la technique du LIBS (Laser-Induced Breakdown Spectrometer)

Pour atteindre ces objectifs, le présent document s'articulera sur trois grands chapitres :

- Chapitre I : qui portera sur des généralités sur le paludisme et les plantes médicinales
- Chapitre II : où seront décrits les méthodologies et le matériel utilisés dans ce travail
- Chapitre III : où nous allons présenter les résultats obtenus (sous forme d'articles), suivis d'une conclusion générale et des perspectives.

L'étude a été financée par **Arcelor Mittal Fondation** à travers l'ONG luxembourgeoise IFBV (Iwerliemen Fer Bredeete Volleker). Cette ONG, dirigée par le Dr Pierre Lutgen, a pour objectif de lutter contre les maladies tropicales plus particulièrement le paludisme.

CHAPITRE I:

Généralités sur le Paludisme et les Plantes Médicinales

PREMIERE PARTIE.

Généralités sur le Paludisme

I- Epidémiologie

I-1 Classification de l'agent pathogène

L'agent pathogène du paludisme est un hématozoaire du genre *Plasmodium* appartenant :

- Embranchement des Apicomplexa
- Classe des Sporozoea
- Sous classe des Coccidia
- Ordre des Haemosporida
- Famille des Plasmodiidae
- Genre *Plasmodium*
- Espèce : *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* et *P. knowlesi*

Cent vingt trois espèces du genre *Plasmodium* ont été répertoriées mais seules les cinq précitées parasitent l'homme et *P. falciparum* est la plus pathogène et responsable de plus de 90% des décès.

Etymologiquement, le nom paludisme est dérivé du mot latin *palus*, qui signifie « marais ». Quant au terme malaria, il désigne la même maladie que le paludisme et provient du mot italien *malaria* signifiant « mauvais air ». Cette étymologie est due au fait que les causes du paludisme ont longtemps été attribuées à des vapeurs empoisonnées provenant des marais. La véritable cause du paludisme tout comme la découverte de son mode de transmission n'ont cependant été identifiées que vers la fin du XIX siècle. En 1861, Lavaran découvrit le *P. falciparum*. En 1898, Ronald Ross démontra l'existence du *Plasmodium* dans l'estomac du moustique du genre *Anopheles*. Ainsi, il existe cinq espèces plasmodiales parasites de l'homme :

- *P. malariae* qui, en plus de l'homme, parasite également les singes africains et est responsable de la fièvre quarte. Sa distribution géographique est disparate. Ce parasite a la plus longue période d'incubation, 14 jours (**Siala et al, 2005 ; Mueller et al, 2007**)
- *P. ovale*, responsable de la fièvre tierce bénigne. Il est très proche de *P. vivax*, avec lequel il a été longtemps confondu. Il remplace là où cette espèce n'existe pas telle en Afrique noire. Ce parasite peut persister dans les hépatocytes causant ainsi des recrudescences après plusieurs mois (**Chin et Coatney, 1971**).
- *P. vivax*, cette espèce est largement répandue mais moins intensément que *P. falciparum*. On la rencontre du 37^e degré de latitude Nord et 29^e degré de latitude Sud. Ce

parasite peut rester longtemps dans les hépatocytes et causant ainsi des recrudescences 5 ans après l'infection (Pukrittayakamee *et al*, 2004).

- *P. knowlesi* qui est un parasite antérieurement connu chez le singe, mais aujourd'hui rencontré chez l'homme particulièrement en Asie du Sud-est. Il est morphologiquement proche de *P. malariae* et génétiquement de *P. vivax*.
- *P. falciparum* : c'est l'espèce la plus redoutable, celle qui tue le plus. Elle est la plus répandue mais sévit dans les régions chaudes seulement. Une infection causée par ce parasite peut entraîner la mort en quelques heures ou jours (Trampuz *et al*, 2003).

I-2 Ultrastructure du merozoite

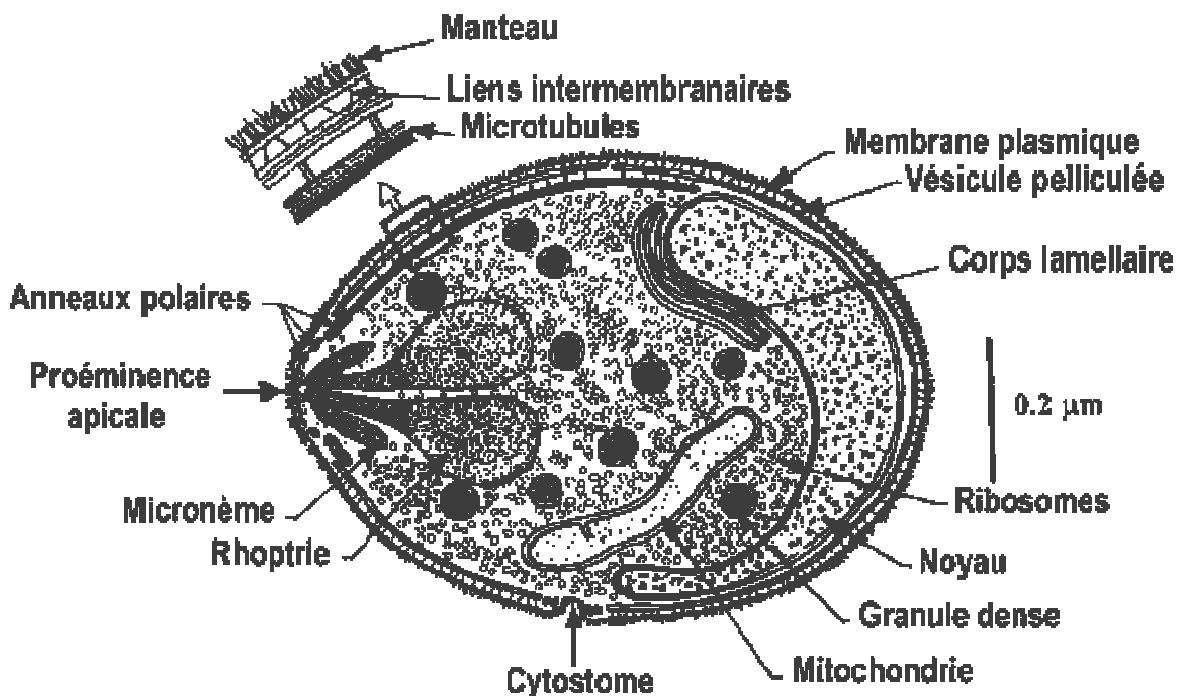


Figure 1 : Coupe transversale de *Plasmodium falciparum* et des ultrastructures de la cellule

<http://ebischoff.free.fr/Palu/palu2.html>

La structure des merozoites de *P. falciparum* a été décrite par Langreth en 1978. C'est une petite cellule polarisée de forme ovoïde de 1,5µm de long et 1µm de large. Comme tous les apicomplexa, cette forme parasitaire possède plusieurs types d'organes apicaux : les rhoptries, les micronémes et les granules denses. Ceux-ci sont impliqués, de manière séquentielle, dans le processus d'invasion de l'érythrocyte. Le merozoite est recouvert d'un manteau, sous lequel, en plus de la membrane plasmique, se trouvent deux autres membranes connectées par un important matériel fibrillaire et relié au cytosquelette.

I-3 Génome de *Plasmodium falciparum*

Le génome de *P. falciparum* est composé de 14 chromosomes et de deux génomes extra chromosomiques. Il possède 6000 à 7000 gènes.

I-3-1 Structure et composition

L'ADN de *P. falciparum* est le génome nucléaire le plus riche en A+T. La composition en A+T (approximativement 82%) est estimée par différentes méthodes (**Tan et al., 2002**). Des études qui ont été menées sur la composition totale en bases avaient permis de conclure que *P. falciparum* est plus proche des *Plasmodiums* de rongeurs et d'oiseaux que ceux des primates. Cette liaison de parenté a été confirmée par la comparaison phylogénétique (**Tarassov et Martin, 1996**).

Cependant la distribution des bases n'est pas uniforme. Le génome de *P. falciparum* contient également des séquences répétées plus particulièrement au niveau des régions subtelomériques qui sont non codantes. Par conséquent, les séquences dominantes sont sous la forme TA (n), T (n), TAA (n).

Les structures des protéines codées par les gènes ont été prédites en utilisant plusieurs programmes de recherche des gènes et arrangées manuellement. Près de 52% des produits estimés de ces gènes ont été détectés dans des lysats cellulaires préparés à partir de plusieurs stades du cycle évolutif du parasite par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) et spectrophotométrie de masse. Ils incluent plusieurs protéines prédites n'ayant aucune similarité avec les protéines des autres organismes (**Tan et al., 2002**). Le génome nucléaire contient une quantité importante d'ARN de transfert (ARNt).

Le génome mitochondrial de *P. falciparum* est petit (environ 6 Kb) et ne code pas d'ARNt. Donc la mitochondrie utilise des ARNt provenant du cytoplasme. Cette importation

d'ARNt à partir du cytoplasme peut servir à la synthèse des protéines (**Tarassov et Martin, 1996** ; **Tan et al., 2002**).

Le génome de l'apicoplaste (organelle ou organite qui ressemble un peu à un chloroplaste) apparaît comme codant suffisamment d'ARNt pour la synthèse de cet organe (**Wilson et al., 1996** ; **Zuegge et al., 2001**).

I-3-2 Structure des chromosomes de *Plasmodium falciparum*

Les chromosomes de *P. falciparum* varient considérablement en longueur, avec une plus grande variation au niveau des régions subtélomériques. Des isolats de *Plasmodium* provenant d'individus résidant dans un même village montrent un très grand polymorphisme qui est dû à une recombinaison entre différents clones du parasite durant sa méiose qui a lieu au sein du moustique (**Hinterberg et al., 1994**).

Les délétions subtélomériques s'étendent souvent bien dans le chromosome et dans certains cas vont altérer les propriétés d'adhésion du parasite en raison de la perte de ou des gènes codant pour l'adhésion des molécules (**Pologe et Ravetch, 1986**; **Day et al., 1993**). Plusieurs gènes intervenant dans la variation antigénique sont localisés au niveau des régions subtélomériques. Les régions subtélomériques des chromosomes montrent un réel degré de conservation dans le génome.

Les centromères n'ont pas été identifiés expérimentalement chez *Plasmodium*. Cependant des centromères « potentiels » ont été identifiés par comparaison de séquences de chromosomes 2 et 3 (**Bowman et al., 1999**). Onze des 14 chromosomes contiennent une région unique de 2 à 3 Kb avec un taux de A et T extrêmement élevé (supérieur à 97%) et des tandems courts imparfaits répétitifs.

I-4 Cycle de développement des *Plasmodium* humains

Ce cycle est complexe et comprend schématiquement trois étapes dont deux se déroulent exclusivement chez l'homme (haploïde et asexué) alors que la troisième commence dans l'organisme humain mais ne peut se poursuivre que chez l'Anophèle femelle (diploïde et sexué), vecteur exclusif du paludisme humain (**Golvan, 1978**). Afin que le cycle complet puisse s'accomplir, il doit y avoir adéquation entre le parasite et son hôte vertébré, ainsi qu'entre le parasite et le moustique vecteur.

I-4-1 Cycle chez l'homme

Il comporte deux étapes qui sont toutes les deux des multiplications asexuées ou schizogonies. La première se déroule dans les hépatocytes (schizogonie exo érythrocytaire) et la seconde dans les hématies (schizogonie intra érythrocytaire). Au cours de la première phase, le parasite n'élabore pas de pigments palustres. Sur le plan clinique, cette multiplication intra hépatique est complètement muette. Au cours de la seconde où le parasite utilise l'hémoglobine du globule rouge, il laisse un résidu pigmentaire, l'hémozoïne. C'est le déversement de ce pigment dans le sang qui cause la fièvre.

I-4-1-1 Cycle exo érythrocytaire

Les sporozoites sont injectés dans un capillaire par l'Anophèle lors d'une piqûre. Ils transittent dans la circulation générale et, en quelques minutes, ils envahissent les hépatocytes grâce à une interaction spécifique entre la protéine majeure de surface du sporozoite (Cercum Sporozoite Protein : CSP) et un récepteur spécifique situé sur la membrane plasmique de l'hépatocyte du côté de l'espace de Disse, espace directement en contact avec le sang circulant. Les sporozoites vont se transformer en trophozoites : éléments arrondis de quelques micromètres (μm) de diamètre uninucléés. Chaque trophozoite va s'accroître, son noyau va se diviser plusieurs fois et autour de chaque noyau fils se produit une condensation cytoplasmique. Après 1 à 2 semaines des schizontes murs ou corps bleus multi nucléés sont formés (**Golvan, 1978**). Ces schizontes conduisent à la libération de plusieurs dizaines de milliers de merozoites dans la circulation. Cette phase de multiplication est asymptomatique et dure 8 à 15 jours selon les espèces. Ces merozoites peuvent, au moins chez *P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae*, et peut être même rarement chez *P. falciparum*, envahir des hépatocytes neufs. Cette schizogonie intra hépatique sera à l'origine des rechutes qui peuvent se produire parfois très longtemps après l'épisode initial.

I-4-1-2 Cycle intra érythrocytaire

Une partie des merozoites (ou peut être la totalité dans le cas de *P. falciparum*) va passer dans le sang et pénétrer les hématies. Seule cette phase sanguine est responsable des symptômes qui peuvent être d'intensité variable. Le merozoite, par son pôle apical, va pénétrer par endocytose dans une hématie et se divise au sein de la vacuole parasitophore en anneau, puis en trophozoite, stade à partir duquel une intense phase réplicative commence. Ce trophozoite se nourrit de la substance même du globule rouge (**Golvan, 1978**). Il grandit

et son noyau se multiplie plusieurs fois de même que son cytoplasme pour donner un schizonte. Celui-ci après segmentation montre une forme caractéristique de rosace, puis libère 8 à 32 merozoites qui, rapidement, réinfectent des érythrocytes sains. L'intervalle de temps qui sépare deux accès correspond à la durée nécessaire pour que le merozoite atteigne le stade de corps en rosace (**Golvan, 1978**). Cet intervalle est de 48 heures chez *P. falciparum*. L'apparition des gamétocytes a lieu en général durant la deuxième semaine qui suit l'infection et ces formes peuvent persister plusieurs semaines après la guérison. Les gamétocytes males et femelles (au dimorphisme sexuel marqué) sont ingérés pendant le repas sanguin par le moustique (**Golvan, 1978**).

I-4-2 Cycle chez l'anophèle

Lorsque l'Anophèle femelle pique une personne infectée, il puise dans son sang des *Plasmodium*s. Toutes les formes circulantes sont tuées et digérées à l'exception des gamétocytes. Ceux-ci vont subir quelques modifications dans l'estomac du moustique pour donner des gamètes males et femelles (**Golvan, 1978**). Le gamétocyte femelle s'arrondit et devient un gamète femelle. Le gamétocyte male divise son noyau et subit un phénomène de l'exflagellation c'est à dire qu'il donne naissance à une dizaine d'éléments allongés et mobiles qui sont les gamètes males. La fécondation a lieu et donne ainsi un œuf qui est le seul stade diploïde de tout le cycle. L'œuf est mobile d'où son nom d'ookinéte. Il traverse la paroi de l'estomac du moustique et s'immobilise sous la membrane qui tapisse sa paroi externe. Il prend alors le nom d'oocyste. Cette brève phase diploïde s'achève par une division méiotique et est suivie par plusieurs milliers de mitoses qui conduisent au développement de sporozoites. L'éclatement de l'oocyste libère ces éléments mobiles et haploïdes (sporozoites) dans l'hémolymphé. Les sporozoites gagnent préférentiellement les glandes salivaires du moustique où ils seront inoculés à l'homme lors d'une prochaine piqûre avec la salive. L'ensemble de ce cycle se déroule chez le moustique entre 10 à 40 jours en fonction de la température et les espèces en cause (**Golvan, 1978**).

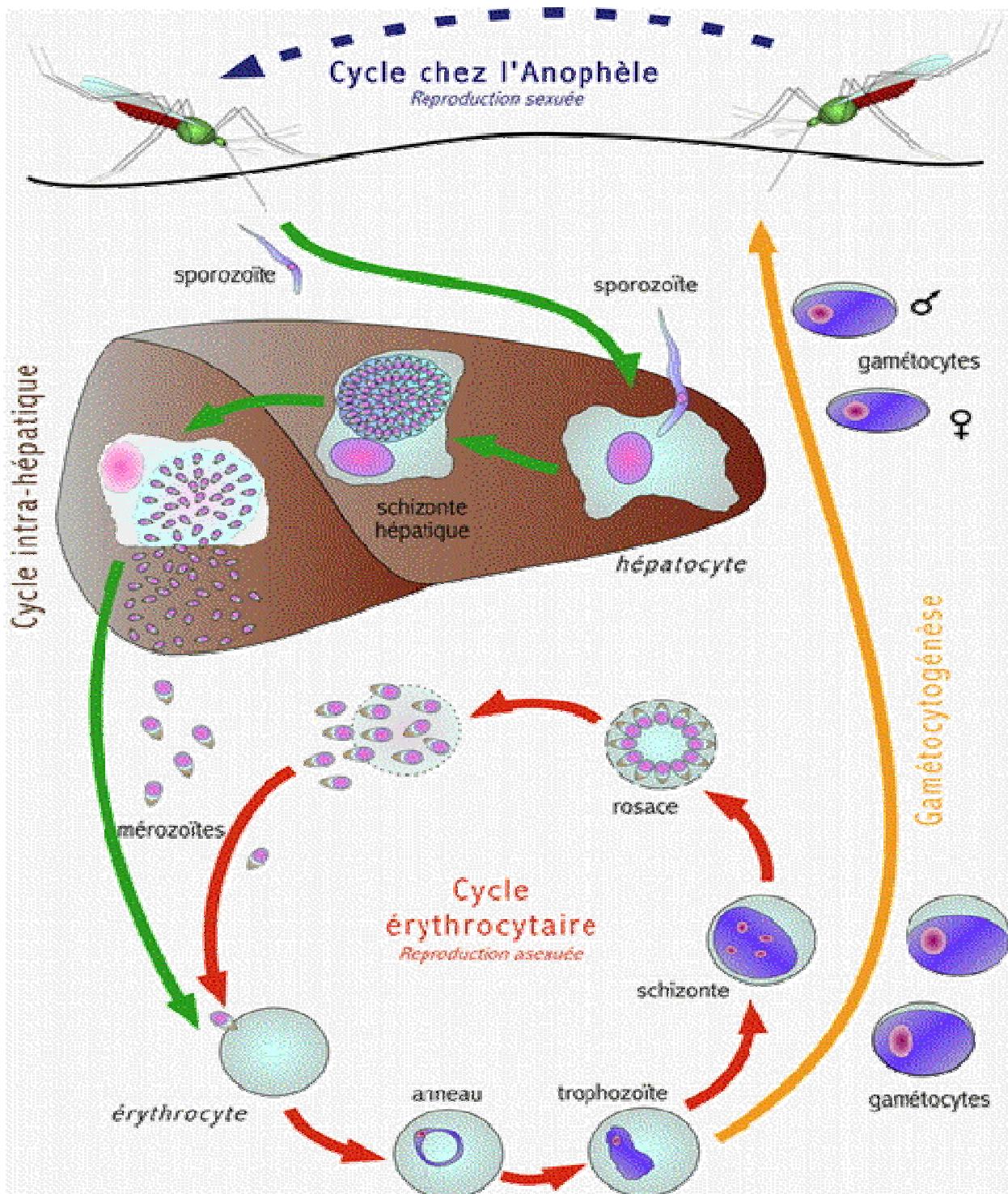


Figure 2 : Cycle de développement de *Plasmodium falciparum*

<http://ebischoff.free.fr/Palu/palu2.html>

I-5 Mode de transmission du paludisme

I-5-1 Les vecteurs du paludisme

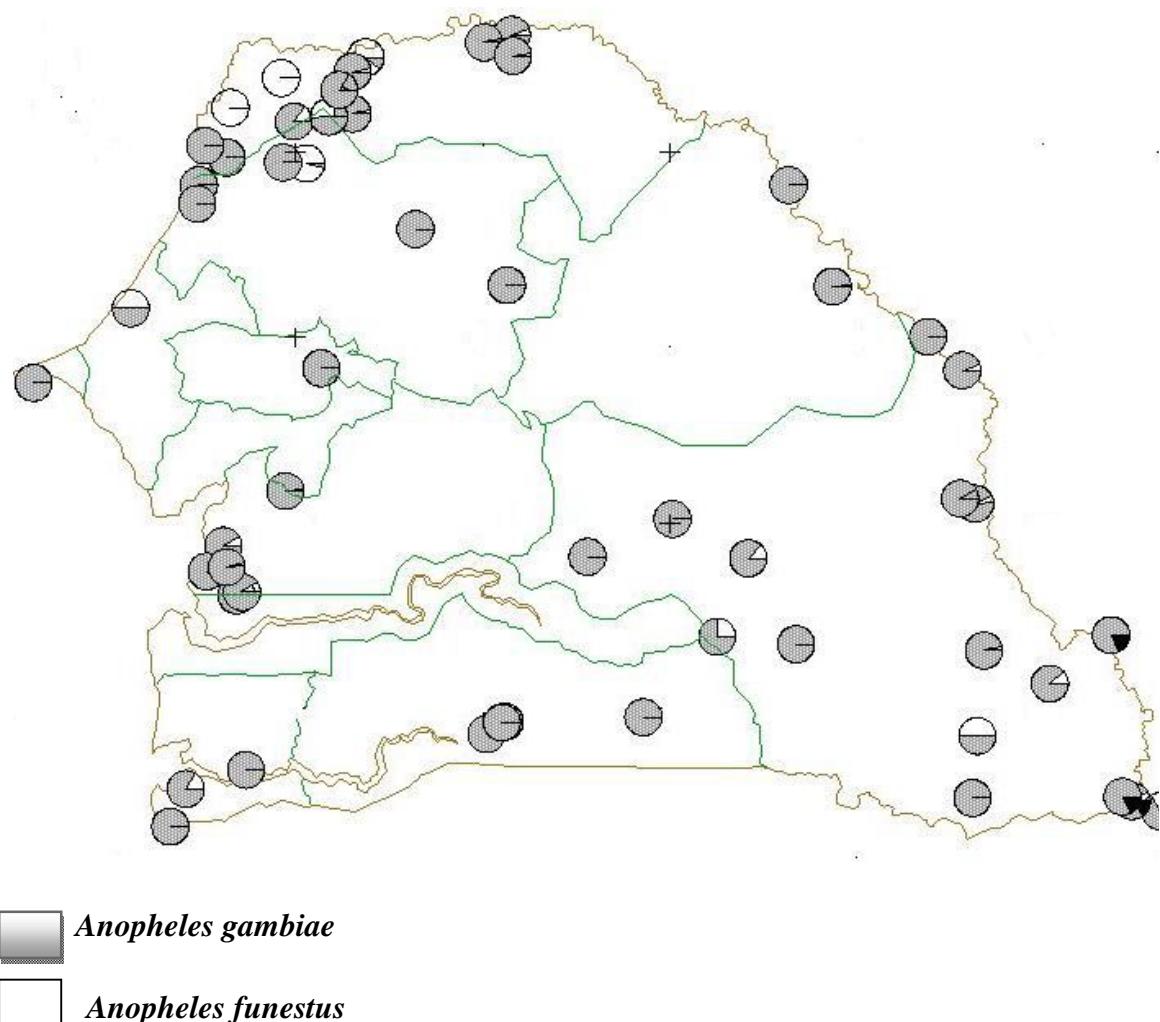
Les vecteurs du paludisme sont des Arthropodes appartenant à la classe des Insectes, à l'ordre des Diptères, au sous-ordre des Nématocères, à la famille des Culicidae, à la sous-famille des Anophelinae et au genre des *Anopheles*. Les Culicidae regroupent l'ensemble des insectes connus sous le nom de moustique. Comme tous les Diptères, ce sont des holométaboles, c'est à dire qu'ils présentent des métamorphoses complètes et passent, au cours de leur vie, par quatre stades successifs : œuf, larve, nymphe et adulte ou imago. Les trois premiers stades sont aquatiques mais les adultes mènent une vie aérienne. Les males se nourrissent uniquement de sucs végétaux, ils ne piquent pas. Les femelles ont, elles, besoin de sang de vertébrés, dont l'homme, pour le développement et la maturation de leurs œufs. C'est à l'occasion de la prise de ces repas sanguins qu'elles ingèrent puis transmettent des germes pathogènes, dont ceux du paludisme. Elles piquent la nuit entre 23 heures et 4 heures du matin. Des piqûres peuvent survenir plutôt (dès 18-19 heures) mais elles proviennent surtout des jeunes femelles peu infectantes. Les températures critiques pour le bon développement de leur cycle se trouvent en dessous de 20°C (**CDC, 2004**).

Tous les vecteurs du paludisme appartiennent au genre *Anopheles* mais tous les anophèles ne sont pas des vecteurs. Sur environ 400 espèces d'anophèles répandues dans le monde, seulement une soixantaine sont des vecteurs du paludisme et une vingtaine sont responsables de la plupart des cas (**Diagne et al., 1994**).

Au Sénégal, vingt espèces d'anophèles sont actuellement connues (**Faye et al., 1995a**). Mais, comme dans les autres régions de l'Afrique subsaharienne, les principaux vecteurs du paludisme sont *Anopheles gambiae s.l* et *An. funestus*. *An. gambiae s.l* est un complexe de six espèces jumelles parmi lesquelles, *An. gambiae* et *An. arabiensis* sont les vecteurs les plus efficaces et les plus répandus. La distribution des espèces du complexe *An. gambiae* au Sénégal est classique. *An. gambiae s.s* et *An. arabiensis* sont sympatriques dans tout le pays et leur fréquence relative est fonction des conditions climatiques.

La reproduction des anophèles exige du sang, de l'eau et de la chaleur. Le cycle « gonotrophique » qui va du repas sanguin à la ponte puis à la recherche d'un nouvel hôte va durer 48 à 72 heures en moyenne en zone tropicale (**Faye et al., 1995a**). De plus, en dessous de 16°C, *P. falciparum* ne peut compléter son cycle dans le moustique et donc assurer sa transmission (**Lindblade et al., 2000**).

Donc plusieurs facteurs tels que l'environnement naturel du vecteur, l'espèce parasitaire ainsi que le comportement et la situation sociale de l'homme influent sur la transmission du parasite. Les facteurs naturels limitant les zones de transmission du paludisme sont étroitement liés à l'habitat des moustiques *Anopheles*. En effet, leur distribution est restreinte entre les altitudes 1500 à 1800 m au dessus du niveau de la mer et se cantonne ainsi dans des zones ayant des points d'eau accessibles. Les anophèles sont thermophiles et anémophiles. On les retrouve dans les crevasses des roches et des sols, des terriers, à l'envers des feuilles d'arbres et des plantes basses et des habitations surtout dans les coins sombres.



I-5-2 Type de transmission

Le paludisme peut être considéré comme :

- épidémique quand on observe des augmentations brutales du nombre de cas (morbilité et mortalité)
- endémique : selon la définition de l'OMS, le paludisme est dit endémique lorsqu'on constate une fréquence appréciable des cas et la persistance de la transmission naturelle pendant plusieurs années consécutives (**OMS, 1974**)¹.

L'indice plasmodique (IP) qui est le pourcentage de sujets examinés qui présentent des hématozoaires dans le sang peut être utilisé pour déterminer l'endémicité palustre. Classiquement l'IP des enfants de moins de 10 ans permet le classement des différentes zones en :

- zone hypo-endémique : $IP < 25\%$
- zone méso-endémique : $25\% < IP < 50\%$
- zone hyper-indémique : $50\% < IP < 75\%$
- zone holo-endémique : $IP > 75\%$.

I-5-3 Faciès épidémiologique

Dans la majeure partie du territoire sénégalais, la transmission du paludisme s'effectue au cours de la saison des pluies et au début de la saison sèche, seule période où la densité des populations vectorielles est importante. Dans les localités situées en zone marécageuse ou à proximité d'un cours d'eau permanent ou temporaire, la transmission peut se poursuivre durant une partie plus ou moins importante de la saison sèche. Dans les zones sahéliennes et soudano sahéliennes, la transmission est très faible et n'est souvent pas perceptible. Par ailleurs les niveaux de la transmission varient considérablement selon les régions et dans une même région, d'une localité à l'autre et d'une année à l'autre suivant les conditions écologiques. On distingue deux principaux faciès épidémiologiques, le faciès tropical et le faciès sahélien.

Dans le faciès tropical, la transmission est saisonnière et longue (5 à 8 mois). Le taux d'inoculation entomologique (TIE), variable d'une année à l'autre, est en général supérieur à 100 piqûres infectées par homme (PIH) et par an (**Faye et al., 1995a**). La morbidité palustre est élevée surtout pendant la période de transmission (supérieur à 20% de l'ensemble de la

¹ OMS. 1974. Paludisme endémique Organisation Mondiale de la Santé Genève. Comité OMS d'experts du paludisme. Séizième rapport Genève.

pathologie fébrile). Ce faciès est observé en Basse Casamance, dans la région de Tambacounda et dans les autres régions, dans certaines localités situées à proximité de cours d'eau permanents.

Dans le faciès sahélien, la transmission s'effectue pendant la courte saison des pluies de durée inférieure à 4 mois. Les TIE, très fluctuants d'une année à l'autre, varient de 0 à une vingtaine de PIH/an. La morbidité est en générale faible mais des épisodes à tendance épidémique peuvent être observés au cours des années où la pluviométrie est particulièrement importante. Dans ce faciès, on note un faible voire une absence de prémunition des individus qui font des accès graves lorsqu'ils sont contaminés. Ce faciès est observé dans les régions Centre et du Nord (**Faye et al., 1995a**).

Cette stratification du paludisme est évolutive, les modifications naturelles de l'environnement et les modifications anthropiques créent des conditions nouvelles en fonction desquelles l'expression de l'endémie peut changer (**Faye et al., 1995a**).

I-5-4 Mode de contamination

La contamination du paludisme peut se faire par trois voies :

- Contamination par l'anophèle femelle : c'est le mode habituel de transmission du paludisme qui nécessite la présence simultanée des trois éléments indispensables à savoir le *Plasmodium*, l'anophèle femelle et l'Homme.

- Contamination par transfusion de sang : elle est réalisée par injection de sang parasité contenant des *Plasmodium* résultants d'une simple schizogonie. Ce mode de contamination est plus rare que le précédent. Il est rencontré avec le paludisme de seringue observé notamment chez les toxicomanes et le paludisme post-transfusionnel.

- Contamination par voie placentaire : c'est une transmission maternofoetale qui est d'autant plus fréquente que les *Plasmodium*s sont particulièrement abondants dans le placenta. Ce mode de transmission est rare dans les zones endémiques.

I-5-5 Les facteurs favorisant la transmission

La température, l'eau, l'humidité et les phénomènes anthropiques constituent les facteurs entraînant la transmission.

- la température : le cycle sporogonique des *Plasmodium* nécessite une température optimale qui se situe autour de 27°C.

- l'eau et l'humidité : les eaux stagnantes constituent des gîtes larvaires et l'humidité influe sur la longévité du vecteur qui diminue quand elle baisse.

Ces trois facteurs expliquent la rareté du paludisme dans les centres villes en zones d'endémies et l'inexistence du paludisme en altitude en zone intertropicale (au dessus de 1000 m en Amérique Latine ou de 3000 m en Afrique).

- Les facteurs anthropiques : les modifications du réseau hydrographique (barrages et irrigations) entraînent la prolifération des vecteurs. Le développement des transports favorisé par les mouvements des populations, entraîne une dissémination des vecteurs. Les conditions socio- économiques défavorables, liées à la pauvreté, peuvent favoriser la transmission (**Seck, 2003**).

II- Manifestations cliniques

Les manifestations cliniques du paludisme sont diverses dans leur expression et leur gravité et dépendant à la fois du parasite (espèce plasmodiale et densité parasitaire) et de son hôte (réceptivité génétique et état immunitaire). Elles vont de l'accès fébrile aigu, avec ou sans défaillance viscérale grave, au parasitisme sanguin prolongé quasi asymptomatique, en passant par un paludisme subaigu et chronique avec anémie et cachexie.

II-1 Les accès palustres simples

Par définition, les accès simples ne comportent pas de signes de malignité, mais ils peuvent à tout moment évoluer vers l'accès pernicieux. L'incubation est en moyenne de 10 à 15 jours avec un intervalle de 7 à 60 jours (**Haddad et al., 1999**).

Lors de l'invasion érythrocytaire, la fièvre est toujours élevée, les céphalées frontales ou occipitales, les courbatures et les troubles digestifs sont particulièrement intenses. Le symptôme classique du paludisme simple est l'apparition cyclique de froid soudain chez le malade, suivi de fièvre et de sueur durant 4-6 heures, phénomène se produisant tous les deux jours dans le cas d'une infection à *P. vivax* et *P. ovale* et tous les trois jours dans le cas d'une infection à *P. malariae* (**Collins et Jeffery, 2007**).

Lors des recrudescences ou des réinvasions, la fièvre peut prendre un caractère périodique avec un rythme tierce (48 h), en fait souvent irrégulier, ou plus bref (36 h). La fièvre est le plus souvent continue vers 39°- 40°C, rémittente avec plusieurs clochers dans la

journée. L'objectif du traitement du paludisme simple est d'éviter son évolution vers les accès graves (**Bell et Molyneux, 2007**).

II-2 Les accès pernicieux ou accès graves ou accès compliqués

Ils constituent le grand drame du paludisme et restent responsable, en dépit des traitements d'un grand nombre de morts. L'accès grave, causé par *P. falciparum*, provoque des mortalités de 100% s'il n'est pas traité (**Trampuz et al, 2003**). Par contre cette mortalité baisse de 15 à 20% si le malade est traité par un antipaludique adéquat (**De Ridder et al, 2008**). L'accès pernicieux au sens strict est défini par l'existence de signes neurologiques aigus au cours d'un paludisme à *P. falciparum* : c'est un neuropaludisme réalisant une encéphalopathie aiguë fébrile. Cependant, pour les experts internationaux de l'OMS, l'élargissement de cette définition à d'autres manifestations de défaillance viscérale paraît utile pour mieux cerner la gravité du pronostic et poser l'indication d'un traitement d'urgence par voie intraveineuse (**OMS, 1990**)². Ces accès graves surviennent préférentiellement chez des sujets non immuns, enfants ou adultes récemment soumis à l'infection palustre. L'accès pernicieux débute soit progressivement, soit brutalement.

Le début progressif est marqué par l'installation d'une fièvre accompagnée des symptômes décrits lors de l'accès de primo invasion, mais l'examen clinique attentif peut révéler une note neurologique (intensité des céphalées, ou prostration) qui augure mal de l'évolution.

Quand le début est brutal, il foudroie un sujet en pleine santé, souvent un jeune enfant, qui en quelques heures sombre dans un coma fébrile.

A la phase d'état, la maladie associe fièvre, troubles neurologiques et d'autres manifestations de défaillance viscérale grave.

A l'examen clinique, l'hépatomégalie est fréquente surtout chez les enfants et la splénomégalie est absente deux fois sur trois. Cet accès peut se compliquer d'insuffisance rénale organique parfois isolée et les surinfections pulmonaires sont fréquentes (**Faye, 1994**).

² OMS. 1990. Several and complicated malaria. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 84, 1-65.

Tableau I: Critères de diagnostic du paludisme grave ou compliqué (OMS, 2010)

Prostration : extrême faiblesse ou, chez l'enfant : « impossibilité de tenir assis pour un enfant en âge de le faire, ou de boire pour un enfant trop jeune pour tenir debout »
Trouble de la conscience : Score de Glasgow modifié \leq 10 chez l'adulte et l'enfant de plus de 5 ans ; Score de Blantyre \leq 3 chez le petit enfant
Détresse respiratoire : définition clinique
Œdème pulmonaire : définition radiologique
Convulsions répétées : \geq 2 par 24h, malgré le traitement de l'hyperthermie
Collapsus circulatoire : PAS \leq 80 mm Hg chez l'adulte en présence de signes périphériques d'insuffisance circulatoire ; PAS \leq 50 mm Hg chez l'enfant
Saignement anormal : définition clinique
Ictère : définition clinique ou bilirubine totale \geq 50 $\mu\text{mol/l}$
Hémoglobinurie macroscopique : urines rouges foncées ou noires
Anémie profonde : Hémoglobine \leq 7g/dl chez l'adulte ou hématocrite \leq 20 % Hémoglobine \leq 5g/dl chez l'enfant ou hématocrite \leq 15 %
Hypoglycémie : Glycémie \leq 2,2 mmol/l
Acidose : pH \leq 7,35 ou bicarbonates \leq 15mmol/l
Hyperlactatémie : lactate plasmatique \geq 5 mmol/l
Hyperparasitémie : notamment \geq 4% chez le non immun
Insuffisance rénale : créatininémie \geq 265 $\mu\text{mol/l}$ après réhydratation ou diurèse \geq 400ml/24h chez l'adulte (\geq 12ml/kg/24h chez l'enfant)

III- Immunité anti palustre

Il est fréquent d'observer, dans les régions où les infections plasmodiales sont fréquentes et répétées, des parasitémies persistant à des taux très faibles et une absence de manifestations cliniques majeures. Cet état d'immunité relative ou « prémunition » est non seulement d'acquisition progressive dans le temps (2 à 5 ans) mais, de plus, est labile puisqu'elle disparaît quelques mois (12 à 24 mois) après que le sujet ait quitté la zone d'endémie. Il est également connu que des sujets « immuns » dans une zone d'endémie donnée, se comportent comme des primo-infectés lorsqu'ils font un voyage dans une autre zone d'endémie donnée. La réponse immunitaire peut être dirigée contre :

- Les formes pré-érythrocytaires : les anticorps dirigés contre les sporozoaires sont capables soit d'altérer leur revêtement de surface, soit d'inhiber leur pénétration dans les hépatocytes, soit même de retentir sur leur développement intra-hépatocytaire.
- Les formes érythrocytaires : Les anticorps capables d'interférer avec le déroulement normal du cycle érythrocytaire peuvent agir contre les constituants de surface des merozoites, contre les structures impliquées lors de la pénétration des merozoites, contre les érythrocytes infectées en les détruisant. Les cellules T jouent également un rôle important dans l'immunité déclenchée lors de la phase érythrocytaire.
- D'autres mécanismes de défenses ont été révélés tels que: la sécrétion de lymphokines, l'activation des cellules mononucléées de la rate, l'induction d'un stress oxydant ou des facteurs non anticorps

IV- Diagnostic du paludisme

IV-1 Diagnostic clinique

Le tableau de l'accès palustre simple à *P. falciparum* est très variable et reproduit celui de nombreuses autres maladies (grippe, hépatite, typhoïde, méningite, gastro-entérite, etc). Le malade se plaint fréquemment de fièvre, de maux de tête, de douleurs diverses (raideur de la nuque quelque fois), de douleurs abdominales et de diarrhées. Le jeune enfant peut être irritable, peut refuser de s'alimenter et vomir.

La fièvre est fréquente mais elle peut être absente. Elle est tout d'abord continue plutôt que tierce (pics de fièvre un jour sur deux) et elle peut ou non s'accompagner de frissons. Non traitée, la maladie et tout spécialement si elle est due à *P. falciparum* peut évoluer vers un accès palustre grave, parfois mortel.

IV-2 Diagnostic biologique

Beaucoup de méthodes sont utilisées pour diagnostiquer le paludisme et parmi celles-ci nous pouvons citer les méthodes directes et les méthodes indirectes.

IV-2-1 Méthodes directes

IV-2-1-1 Le frottis mince et la goutte épaisse

Le frottis mince est une technique d'étalement du sang prélevé chez le patient sur une lame. Il permet d'observer au microscope la présence de parasites en cas d'infection. Le prélèvement de sang doit se faire au bout du doigt avec confection immédiate de frottis. La goutte de sang recueillie est placée sur une lamelle et on passe à l'étalement de la goutte. Le frottis doit être effectué avec soin de manière à ne comporter qu'une couche cellulaire. Ensuite cette goutte est séchée, fixée à l'alcool avant d'être colorée au GIEMSA. La coloration ne doit pas comporter des dépôts de colorants qui gêneraient considérablement la lecture des lames et pourraient être cause d'erreurs. Le frottis après coloration sera lû avec la plus grande attention au microscope pendant 30 minutes environ avant de rendre un résultat négatif. Le fait de trouver un élément parasitaire ne justifie pas l'arrêt de la lecture de la lame, il peut en effet exister un polyparasitisme.

En ce qui concerne la goutte épaisse, il consiste à déposer sur une lame de verre une goutte de sang (2 fois le volume utilisé pour le frottis). Ensuite avec le coin d'une autre lame, étaler régulièrement le sang sur une surface de 1 cm de diamètre en tournant régulièrement pendant 2 minutes. Retourner la lame et laisser sécher à plat sur un support soit pendant 24 heures à la température ambiante soit pendant 1 heure à l'étuve à 37°C. Ne jamais fixer la lame à l'alcool. Enfin on passe à la coloration au GIEMSA et à la lecture de la lame. La goutte épaisse permet de concentrer les parasites s'ils sont peu nombreux sur une petite surface ce qui permet de les voir plus facilement au microscope et de dépister une parasitémie faible. L'association frottis goutte épaisse doit être systématique. Elle se pratique volontiers sur la même lame lors d'enquêtes épidémiologiques.

IV-2-1-2 La PCR ou Polymerase Chain Reaction

A- Définition de la PCR

La PCR est une technique de biologie moléculaire mise au point en 1985 par Karry Mullis (**Mullis, 1990**). C'est une technique d'amplification génétique, c'est à dire qu'elle permet de repérer un fragment d'ADN ou de gène précis, même présent en quantité infime dans un mélange, puis de le multiplier rapidement.

B- Technique de la PCR

Dans la cellule, la duplication a lieu avant la mitose. L'enzyme qui intervient dans cette duplication est l'ADN polymérase. Cette enzyme allonge les chaînes de nucléotides. Après la séparation des deux brins de la molécule d'ADN (on parle de dénaturation), des fragments d'ADN appelés amorces s'apparentent (ou s'hybrident) à leur séquence complémentaire au niveau de chaque brin d'ADN. L'ADN polymérase les allonge par ajout de nucléotides, aboutissant à la formation d'une copie complémentaire de chaque brin d'ADN. On obtient ainsi deux nouvelles molécules identiques à la molécule de départ (**Darnel et Baltimore, 1988**). Il y a eu polymérisation.

La PCR est basée sur ce même principe mais elle utilise deux amorces qui sont sous forme d'ADN simple brin. Elle comporte trois étapes principales qui sont : la dénaturation, l'hybridation et l'extension.

IV-2-1-3 Le QBC ou le « Quantitative Buffy Coat »

Il est basé sur la centrifugation du sang recueilli sur tube capillaire contenant de l'acridine. Après la centrifugation, l'interface, entre les globules blancs et les globules rouges, est examinée au microscope à fluorescence et l'ADN des parasites se lie à l'acridine orange. Cet ADN, se présente alors au microscope sous forme de taches brillantes. Cette technique apparaît plus sensible que la goutte épaisse et le frottis mince, cependant l'identification des espèces demeure difficile et son coût est prohibitif.

IV-2-2 Méthodes indirectes : Les tests de diagnostic rapides du paludisme (TDR)

Ces méthodes sont basées sur le principe de la détection du HRP-2 plasmodial ou de la LDH du parasite. Les TDR peuvent se présenter sous la forme d'une bandelette réactive ou d'une cassette. Au début ces tests étaient basés sur l'utilisation du Glutamate Déshydrogénase (GluDH) de *P. falciparum* comme antigène cible (*Pf*GluDH) mais il a été remplacé par le Lactate Déshydrogénase (LDH) de *P. falciparum* qui est l'une des enzymes les générées par *P. falciparum* (**Delplace et al, 1987 ; Higgins et al, 1989**). Elles ont la possibilité de renforcer non seulement la vitesse mais aussi l'exactitude du diagnostic du paludisme à *P. falciparum*. Cependant, elles ne peuvent pas donner une idée exacte de la densité parasitaire (DP). Par ailleurs, le test utilisant le HRP-2 détecte les antigènes circulants du parasite plusieurs jours après l'élimination des parasites. De ce fait, il faut avoir en mémoire qu'un test positif ne signifie pas toujours une infection active. Les tests basés sur la recherche de la LDH permettent de diagnostiquer la présence d'autres espèces plasmodiales.

V- Traitement du paludisme : les molécules antipaludiques, efficacité et contrôle

Un traitement antipaludique doit être efficace, accessible, bien toléré et peu onéreux car les populations majoritairement concernées ont un faible revenu et un accès aux soins limités. *P. falciparum* possède des cibles sur lesquelles agissent les molécules antipaludiques.

V-1 Les cibles plasmodiales

Le parasite *Plasmodium* dispose pour son développement intra érythrocytaire de métabolisme et de moyens de défenses spécifiques qui constituent autant de cibles aux antipaludiques. Nous distinguons :

- La vacuole digestive du parasite qui est le siège de la digestion de l'hémoglobine, de la cristallisation de l'hème et où des moyens de défenses spécifiques contre le stress oxydatif sont retrouvés.
- Un cytoplasme comportant le cytosol et deux organismes essentiels, la mitochondrie et l'apicoplaste. Ils sont nécessaires à la biosynthèse des acides nucléiques.
- Une membrane plasmique constituée de phospholipides, de canaux calciques et parasitophores, siège du trafic nutritionnel.

V-2 Les molécules antipaludiques

La plupart des antipaludiques sont des schizonticides. Ils ont une action sur les formes endoérythrocytaires du cycle schizogonique. Ils suppriment (traitement curatif) ou préviennent (prophylaxie suppressive) l'apparition des symptômes cliniques. En plus des schizonticides, il existe les gamétocytocides qui ont une action sur les formes à potentiel sexué. Ils ont en outre un certain degré d'activité sur les formes exo érythrocytaires tissulaires mais ont une tolérance très inférieure à celle des schizonticides. Les amino-8-quinoléines (tafenoquine et primaquine) sont des molécules actives sur les phases hépatiques du parasite.

V-2-1 Les schizonticides

Ce groupe comprend les dérivés quinoléiques et les dérivés de l'artémisinine

Les dérivés quinoléiques comprennent les amino-4-quinoléines (chloroquine et amodiaquine) et les amino-alcools (mefloquine, halofantrine, luméfantrine). Ces molécules interfèrent avec la digestion de l'hémoglobine dans la vacuole nutritive en inhibant la formation de l'hémozoine.

Les dérivés de l'artémisinine constituent une nouvelle classe d'antipaludique dans la lutte contre le paludisme. Ces molécules de type peroxyde interfèrent aussi dans la digestion de l'hémoglobine par libération de radicaux libres toxiques pour le parasite. Les dérivés de l'artémisinine ont aussi une action gamétocytocide qui réduit la transmission et limite les risques de voir émerger les résistances.

V-2-2 Les inhibiteurs des acides nucléiques ou antimétaboliques

Ils bloquent la division du noyau de l'hématozoaire. Ce groupe comprend les antifolates, les naphtoquinones et les antibiotiques.

Les antifolates sont réparties en deux familles, les antifoliques (les sulfamides dont la sulfadoxine et le sulfone) et les antifoliniques (proguanil et pyriméthamine). Ils agissent au niveau de la voie de synthèse des folates, qui sont essentiels à la biosynthèse des acides nucléiques du parasite. Les antifoliques inhibent la dihydroptéroate synthétase (*Dhps*) qui produit l'acide folique et les antifoliniques la dihydrofolate réductase (*Dhfr*) qui produit l'acide folinique.

Les naphtoquinones : l'atovaquone est un inhibiteur puissant des fonctions mitochondrielles en bloquant la chaîne de transfert des électrons au niveau de son enzyme-clé, la dihydroorotate déshydrogénase. Elle a peu d'impact thérapeutique lorsqu'elle est utilisée

seule. En combinaison avec un métabolite (proguanil), une intéressante synergique d'action s'observe grâce à une inhibition séquentielle de la synthèse des pyrimidines.

Les antibiotiques : les tétracyclines (doxycycline), les macrolides (érythromycine, azythromycine, clindamycine) peuvent inhiber la synthèse protéique, par inhibition de certaines fonctions de l'apicoplaste.

V-2-3 Les associations d'antipaludiques

Les nouveaux antipaludiques qui ont fait l'objet de développements récents sont tous associés, au moins en bithérapie, et se démarquent de la plus ancienne des associations, la sulfadoxine-pyriméthamine capable de sélectionner rapidement des mutants résistants. Certaines associations sont fixes : l'atovaquone-proguanil, l'artéméther-luméfantrine et la chlorproguanil-dapsone. D'autres associations sont libres, associant toujours un dérivé de l'artémisinine vu la rapidité d'action, l'impact de la transmission et l'absence de chimiorésistance de *P. falciparum* : artésunate-méfloquine, artésunate-amodiaquine, artéméther-proguanil, artésunate-suffadooxine-pyriméthamine.

V-2-4 Les gamétocytocides

Les gamétocytocides agissent en détruisant les gamétocytes du sang humain. Ils entravent ainsi le cycle sporogonique et bloquent la transmission de l'espèce plasmodiale. Les gamétocytocides actuellement connus sont tous des amino-8- quinoléines sont peu employés. Découverte en 1924, la plasmochin (ou plasmoquine) allemande fut reconstituée en France sous le nom de Praequine ® en 1931. La rhodoquine, synthétisée peu après, lui était proche parente. Toutes deux sont abandonnées. La primaquine qui fut ensuite proposée se révéla également toxique. Elle est méthémoglobinisante et hémolytique, notamment chez le sujet déficitaire enzymatique en glucose 6-phosphate déshydrogénase

V-3 Molécules antipaludiques issues des plantes médicinales

Deux antipaludiques extraits des plantes médicinales sont toujours parmi ceux les plus utilisés et les plus efficaces. Il s'agit de la quinine qui demeure un antipaludique majeur préconisé dans le cas de traitement des accès palustres graves et l'artémisinine (*qinghaosu*) ainsi que ses dérivés (artésunate, artéméther et artéether) obtenus par hémisynthèse qui occupe actuellement une place primordiale lors des paludismes dits récessifs ou neurologiques.

VI- La lutte anti vectorielle

La découverte, à la fin du siècle dernier, du rôle des arthropodes dans la transmission des agents pathogènes a fait du contrôle des « vecteurs » des parasites, bactéries et virus, un moyen de prévention des maladies qu'ils provoquent. En matière de paludisme, la lutte anti vectorielle vise à supprimer ou limiter le contact homme-vecteur pour prévenir l'infection par des *Plasmodiums*. Elle est complémentaire de la lutte contre le parasite lui-même par la chimioprophylaxie, les traitements préventifs intermittents ou les traitements curatifs. Aujourd'hui l'élimination des populations de vecteurs n'est pas la finalité de la lutte anti vectorielle. Son objectif est de diminuer le poids du paludisme. La lutte anti vectorielle se fait :

- Au stade adulte : pour lutter contre les anophèles au stade adulte, on peut utiliser des moustiquaires imprégnées d'insecticides (MII) ou procéder par des pulvérisations intra domiciliaires d'insecticides à effet rémanent.
- Au stade larvaire du vecteur : Les moyens de lutte contre les larves permettent d'empêcher la prolifération des moustiques. La lutte contre les larves peut prendre plusieurs formes comme éliminer les lieux de pontes, modifier les lieux de pontes et les rendre inaccessibles aux moustiques adultes. Mais aussi on peut introduire des poissons larvivores, épandre les larvicides et des inhibiteurs de croissance des insectes.

VII- Résistance de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques et contexte actuel

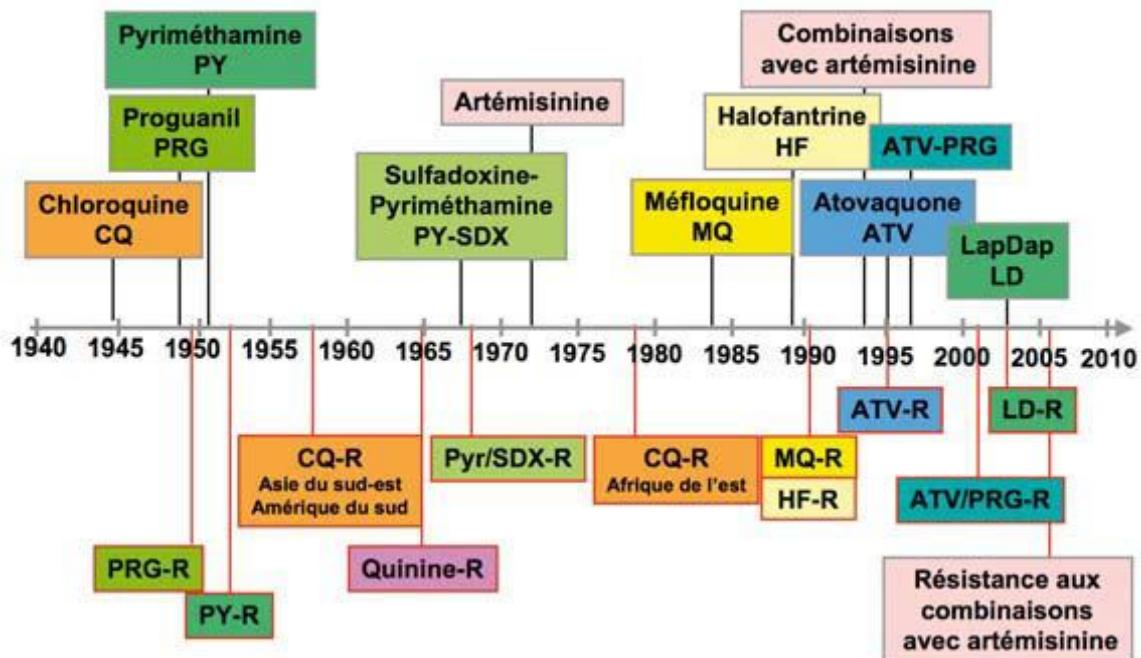


Figure 4 : Introduction des antipaludiques et apparitions des résistances (R) de *Plasmodium falciparum* (Pradines et al, 2010)

VII-1 Aperçu général de la résistance

La chimiorésistance est définie par l'OMS comme étant : « la capacité d'une souche parasitaire à survivre ou à se reproduire malgré l'administration d'un médicament antipaludique employé à des doses égales ou supérieures aux doses ordinairement recommandées mais dans les limites de tolérance du sujet ».

La résistance aux antipaludiques dans le monde est un phénomène qui s'aggrave depuis 40 ans selon plusieurs dimensions :

- extension géographique, à partir de l'Amérique du Sud et du Sud-est Asiatique,
- augmentation continue des pourcentages de souches résistantes,
- augmentation du niveau de résistance des souches,
- poly-chimiorésistance.

La véritable menace en terme de santé publique est apparue au début des années 1960 avec la résistance à la chloroquine, antipaludique le plus utilisé et le moins onéreux (**Charmot**

et Coulaud, 1988). Cette résistance, qui avait épargné l'Afrique pendant 20 ans a fait son apparition au début des années 80, elle s'est ensuite répandue extrêmement rapidement. Cette évolution africaine avait d'abord concerné la chloroquine, ensuite d'autres antipaludiques et actuellement dans plusieurs régions on parle de polychimiorésistance. Pour ce qui est de l'Afrique de l'Ouest, la résistance *in vivo* fut confirmée en janvier 1987, par une enquête du Centre de Référence de la Chimiorésistance du Paludisme des états de l'organisation de coordination et de coopération pour la lutte contre les grandes endémies - OCCGE) au Bénin puis au Togo en février de la même année. La diminution de la sensibilité *in vitro* de la quinine et de la chloroquine décrite au Sénégal en 1984 n'a pas été confirmée *in vivo* à cette époque. La résistance de *P. falciparum* à la chloroquine est présente aujourd'hui dans presque toutes les zones d'endémie d'une manière toute fois hétérogène dans une même région sauf dans le Sud-est asiatique où la résistance est totale. Face à cette situation, il a fallu recourir à d'autres antipaludiques (association sulfadoxine-pyriméthamine). C'est une association schizonticide utilisée depuis 1965. Sa demi-vie est de 4 jours, les sujets « acétyleurs rapides » élimineront rapidement la molécule. Son action est lente. Pour se développer, le parasite doit synthétiser son ADN, et utiliser les folinates, dérivés des folates. La dihydroptéroate synthétase et la dihydrofolate réductase permettent la synthèse d'acide folique à partir, entre autres, d'acide paraamino- benzoïque puisé chez l'hôte. Utilisée avant uniquement en traitement préventif, elle est devenue le médicament de choix pour la prophylaxie chez la femme enceinte en zone de chloroquinorésistance. Elle est administrée en traitement préventif intermittent chez la femme enceinte en raison d'une cure au 2ème et 3ème trimestre. Elle est présentée en comprimés dosés à 500 mg de sulfadoxine et 25 mg de pyriméthamine ou en ampoules injectables par voie intramusculaire de 2 ml (400 mg de sulfadoxine et 20 mg de pyriméthamine). Les cas de résistance à cette association sont de plus en plus fréquents et ceci constitue un facteur limitant pour ce médicament. La sulfadoxine inhibe l'action de la dihydroptéroate synthase (*Dhps*) alors que la pyriméthamine inhibe celle de la dihydrofolate réductase (*Dhfr*). Malgré son efficacité, la SP a vite rencontrer une résistance en Afrique en général et au Sénégal en particulier. De nos jours, l'arsenal thérapeutique pour lutter contre le paludisme en Afrique est limité. La chloroquine en monothérapie est toujours utilisée en traitement curatif, malgré l'inefficacité démontrée. Parce que l'efficacité thérapeutique de ces molécules a été démontrée, l'OMS recommande d'utiliser (German et Aweeka, 2008):

- les dérivés de l'artémisinine en association ou la quinine, pour les traitements curatifs,

- la chloroquine-proguanil, la méfloquine ou l'atovaquone-proguanil, pour la chimioprophylaxie.

L'évaluation permanente de l'efficacité des antipaludiques est nécessaire pour assurer aux populations cibles des médicaments efficaces et bien tolérés, afin de mieux lutter contre ce parasite qui a montré sa capacité d'adaptation (**Ringwald et al, 2002**).

VII-2 Facteurs d'apparition et d'extension

Les circonstances épidémiologiques de l'apparition, du maintien et de la diffusion de la chimiorésistance semblent dépendre de plusieurs facteurs. En effet l'apparition de la chimiorésistance de *P. falciparum* nécessite l'intervention de trois principaux facteurs : le parasite, l'antipaludique et l'hôte humain.

Des études génétiques effectuées sur des isolats de *P. falciparum* (formes asexuées sanguines) de différentes origines géographiques ont montré que l'infestation par *P. falciparum* chez l'homme est généralement mixte, comportant des parasites génétiquement distincts. En particulier, ces parasites présentent une grande hétérogénéité dans la réponse à un antipaludique donné ; des parasites sensibles coexistant avec des parasites résistants à des degrés différents.

Ainsi, l'utilisation de faibles doses d'antipaludique (doses prophylactiques ou infra thérapeutiques lors d'automédication ou de traitement dans les dispensaires), va sélectionner, chez le malade, des parasites asexués résistants. « La rapidité de cette sélection est directement proportionnelle à la pression médicamenteuse, au nombre de parasites exposés, au taux de mutation chez les parasites ». Elle augmente également avec la longueur de la demi-vie de l'antipaludique utilisé.

D'autre part, l'apparition de la résistance peut être due à l'existence d'une résistance croisée entre des antipaludiques présentant une parenté structurale ou un mécanisme d'action semblable. En zone d'endémie palustre, cette sélection va être dépendante ou non de l'apparition de la résistance de *P. falciparum* à l'antipaludique, cela dépendant de l'état de l'immunité antipalustre du sujet vis-à-vis de cette espèce

VIII- Résistance des vecteurs aux insecticides

Pour pouvoir employer efficacement les insecticides dans la lutte anti vectorielle, il faut que l'espèce de vecteur ciblée soit effectivement sensible à ces produits dans les conditions d'utilisation sur le terrain. Les essais de laboratoire ont permis d'observer couramment des résistances aux insecticides dans de nombreuses populations de vecteurs partout dans le monde. Ces résistances peuvent être dues à la détoxicification naturelle des insecticides par de enzymes ou à une mutation de la cible de l'insecticide. Les différents mécanismes qui permettent aux insectes de résister à l'action des insecticides peuvent être regroupés en trois catégories.

VIII-1 La résistance métabolique

La résistance métabolique est le mécanisme le plus commun chez les insectes en général. Ce mécanisme repose sur les systèmes enzymatiques que tous les insectes possèdent pour assurer la détoxicification naturelle des éléments étrangers. Généralement trois catégories d'enzymes interviennent dans cette fonction, à savoir les estérases, les mono oxygénases à cytochromes P450 et les glutathion-S-transférases. Ces enzymes sont surproduites par les moustiques résistants par rapport aux moustiques sensibles et leur permettent de métaboliser ou de dégrader les molécules d'insecticide avant qu'elles n'exercent un effet toxique sur leur cible. La surproduction d'enzymes peut être due à une modification d'un gène régulateur contrôlant le degré d'expression de l'enzyme (**Rooker et al, 1996**) ou à une augmentation du nombre de copies des gènes qui codent ces enzymes (**Wirth et al, 1990 ; Devonshire et Field, 1991**).

VIII-2 La résistance par modification de la cible

Le second type de mécanisme de résistance communément trouvé chez les insectes est la modification de la cible de l'insecticide. Les principales cibles des insecticides sont des récepteurs ou des enzymes du système nerveux : l'acétylcholinestérase (AChE), le canal sodium voltage dépendant (CNaVdp) et le récepteur de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA). Les mutations au niveau de la cible sont des mécanismes de résistance très efficaces qui s'accompagnent de phénomènes de résistance croisée pour tous les insecticides agissant sur la même cible. La cible des organophosphorés et des carbamates est l'acétylcholinestérase (AChE), une enzyme située dans les synapses des cellules nerveuses. Les insecticides des familles des carbamates et des organophosphorés agissent sur l'acétylcholinestérase en

l'inhibant, ce qui entraîne la mort de l'insecte par accumulation de l'acétylcholine (substrat de l'enzyme) dans la fente synaptique. Plusieurs formes mutées de cette enzyme (également appelées acétylcholinestérase insensible) ont présenté une affinité diminuée pour ces insecticides. La forme mutée retrouvée chez *An. gambiae*, principal vecteur du paludisme en Afrique inter-tropicale, résulte d'une mutation de la glycine en sérine en position 119 conférant une résistance croisée aux carbamates et aux organophosphorés (Weill *et al*, 2004). Les CNaVdp interviennent dans la transmission de l'influx nerveux le long des axones. Les pyréthrinoïdes et le DDT agissent au niveau des CNaVdp et perturbent le fonctionnement normal des canaux et la transmission de l'influx le long des fibres nerveuses. Une mutation ponctuelle remplaçant une leucine par une phénylalanine au niveau du sixième segment du domaine II du gène codant le CNaVdp (mutation *kdr* Leu-Phe) confère la résistance aux pyréthrinoïdes et au DDT en Afrique de l'Ouest (Dong, 1997). En Afrique de l'Est, c'est plutôt le remplacement de la leucine par une sérine à la même position qui confère la résistance aux pyréthrinoïdes (mutation *kdr* Leu-Ser) (Verhaeghen *et al*, 2006). Les organochlorés du groupe des cyclodiènes ont leur site d'action au niveau des récepteurs du GABA du système nerveux central. Une seule mutation ponctuelle sur des récepteurs GABA est responsable de la résistance aux cyclodiènes chez plusieurs espèces d'insectes. Tout comme dans le cas de l'AChE1, cette mutation entraîne une modification structurale du site d'action réduisant ainsi la fixation des cyclodiènes.

VIII-3 La résistance comportementale

La résistance comportementale repose sur une modification du comportement de l'insecte lui permettant d'éviter un contact avec la molécule d'insecticide. La résistance comportementale est moins bien connue que les autres mécanismes de résistance.

IX- Méthodes d'évaluation de la chimiorésistance de *Plasmodium falciparum*

L'étude de la chimiosensibilité de *P. falciparum* chez l'homme, qui concerne principalement les schizontocides sanguins, peut être effectuée par des méthodes *in vivo*, *in vitro* et par l'étude des marqueurs génétiques.

IX-1 Les tests *in vivo*

Le principe consiste à administrer au sujet parasité par des trophozoïtes de *P. falciparum*, à l'exception de toute autre espèce plasmodiale, une dose curative du

schizonticide à tester, puis à évaluer dans le temps, l'effet du médicament sur la réduction et la disparition de la parasitémie. Les méthodes OMS constituent les méthodes de référence et sont de loin les plus utilisées. Le médicament est administré par voie orale à une dose standard qui dépend de l'antipaludique à tester. La parasitémie est déterminée sur la goutte épaisse ou sur le frottis sanguin. Selon la durée de suivi on distingue deux méthodes :

- le test prolongé de l'OMS où la parasitémie est évaluée sur une période de 29 jours pour les zones de faible transmission, quotidiennement de J0 à J7, puis à J14, J21 et J28 (29e jour) ; 14 jours pour les zones de forte transmission
- Le test standard, où la parasitémie est déterminée quotidiennement pendant 8 jours, de J0 à J7.

NB : Ces tests à la goutte épaisse et au frottis sanguin sont confirmés par la PCR en cas de positivité pour déterminer une recrudescence ou une réinfestation.

L'interprétation des résultats est basée sur deux paramètres principaux à savoir, le jour de la disparition des trophozoïtes et le taux de réduction de la parasitémie après le traitement, par rapport à la parasitémie de J0. Cinq types de réponses ont été définis:

- Sensible : disparition des parasites à J7 au plus tard, sans recrudescence à J14, J21 et J28.
- Résistance de niveau RI tardif : disparition des parasites à J7, suivie d'une recrudescence à J14, J21 ou J28.
- Résistance de niveau RI précoce : disparition des parasites avant J7, suivie d'une recrudescence à J7.
- Résistance de niveau RII : absence de disparition des parasites, mais réduction importante de la parasitémie.
- Résistance de niveau RIII : aucune réduction appréciable de la parasitémie n'est observée.

Le test prolongé permet d'identifier les cinq types de réponses et le test standard toutes les réponses sauf les réponses sensibles et le niveau RI tardif.

Les inconvénients des méthodes *in vivo* sont décrits par Le Bras et Savel. Il s'agit de :

- la nécessité d'examiner plusieurs fois le sujet.
- l'existence de fausses résistances liées à des taux sanguins de l'antipaludique inférieurs au seuil d'activité. C'est le cas lorsque le médicament est sous dosé, ou lorsqu'il est incomplètement absorbé par suite de vomissements précoce ou d'accélération du transit.

D'où la nécessité d'évaluer, après le traitement, le taux d'antipaludique dans le sang ou les urines.

IX-2 Les tests *in vitro*

Les méthodes *in vitro* permettent une détermination objective de la sensibilité de *P. falciparum* à tous les schizonticides sanguins agissant directement. Elles sont en effet peu ou pas influencées par l'immunité contrairement aux méthodes *in vivo*. En zone d'endémie, elles permettent donc de détecter la chimiorésistance de *P. falciparum* à son émergence. On distingue les anciennes et les nouvelles méthodes.

IX-2-1 Les anciennes méthodes

Ce sont des méthodes qui utilisent du glucose comme milieu d'incubation. Le sang total prélevé chez le sujet présentant des trophozoïtes de *P. falciparum* est additionné de glucose à la concentration finale de 50/100 puis incubé en présence de concentrations croissantes de l'antipaludique à tester, comparativement à un témoin sans antipaludique. On évalue ensuite au microscope sur goutte épaisse, l'effet inhibiteur des différentes concentrations sur la maturation des trophozoïtes en schizontes car les parasites sont synchrones dans le prélèvement de sang. L'interprétation des résultats est basée sur la concentration minimale d'antipaludique inhibant complètement la maturation en schizontes (CMI). Deux macrotests ont été décrits parmi lesquelles on peut citer : Le Macrotest de Rieckmann et Le Macrotest OMS.

IX-2-1-1 Le Macrotest de Rieckmann

C'est la première technique à être utilisé sur le terrain. Elle emploie 1 ml de sang défibriné par concentration .L'incubation est faite à l'étuve à 38°5-40°C pendant 24 heures. Les schizontes ne sont comptés sur goutte épaisse comparativement à 100 parasites asexués.

IX-2-1-2 Le Macrotest OMS

C'est le macrotest de Rieckmann standardisé pour tester la chloroquine et la mèfloquine. Il a été largement utilisé et emploie des flacons prédosés en antipaludiques. L'incubation est faite à 38°5 pendant 24 à 28 heures. Ces macrométhodes ont l'inconvénient d'utiliser une grande quantité de sang. Il faut au moins 10ml de sang par antipaludique pour tester une souche .En outre le sang doit contenir une prédominance de trophozoites âgés de *P. falciparum*, en effet ce sont ces formes qui sont capables d'évoluer en schizontes à trois

noyaux ou plus en 24 heures d'incubation. C'est pour ces raisons que ces méthodes ont été remplacées par de nouvelles méthodes.

IX-2-2 Les nouvelles méthodes

Elles sont basées sur le principe de la culture continue de *P. falciparum* (formes érythrocytaires) qui a été mise au point par Trager et Jensen et par Haynes et collaborateurs (1976). Brièvement cette culture est réalisée dans un milieu liquide synthétique (RPMI tamponné) qui est enrichi en sérum humain non immun (10% environ). L'incubation est faite à l'étuve à 37° dans une atmosphère enrichie en gaz carbonique (95% air et 5% CO₂) qui est obtenue dans un dessicateur avec bougie ou dans un incubateur à CO₂. Selon le mode d'évaluation utilisé, on distingue des méthodes microscopiques, isotopiques et fluorométriques. Cette dernière constitue une innovation de taille dans l'évaluation de la sensibilité *in vitro* de *P. falciparum* aux différents antipaludiques.

Par ailleurs, il faut noter que les méthodes isotopiques et fluorométriques sont très sensibles mais se limitent à des laboratoires spécialisés car nécessitant tout un arsenal de matériel coûteux.

A ces méthodes s'ajoutent les techniques de biologie moléculaire utilisées surtout dans l'étude des marqueurs génétiques de la résistance qui occupe aujourd'hui une place très importante dans le cadre de la recherche.

IX-2-2-1 Les méthodes microscopiques

Les méthodes microscopiques comportent les méthodes à court terme et celles à long terme.

i-Les méthodes à court terme

Elles évaluent l'effet inhibiteur de différentes concentrations de l'antipaludique sur la maturation des trophozoites en schizontes, comme dans les macrométhodes. Elles dérivent toutes de la micro méthode de 24 heures décrite par Rieckman et collaborateurs pour tester la sensibilité de *P.falciparum* provenant de singe *Aotus*.

i-1 Le microtest

C'est une méthode standardisée qui utilise des plaques prédosées avec l'antipaludique (96 puits) et du sang capillaire hépariné .Chaque puits reçoit 50µl de la suspension globulaire parasitée à 5% hématocrite dans le milieu RPMI. Apres une incubation de 24 à 26 heures à

37°C, les schizontes sont comptées sur goutte épaisses colorées au Giemsa en regard de 200 parasites asexués.

i-2 Le microtest OMS

Il utilise des plaques pré dosées qui sont actuellement commercialisées (chloroquine, amodiaquine, quinine, méfloquine et association sulfadoxine/pyriméthamine). C'est le microtest qui a été standardisé. L'interprétation de ses résultats est basée sur la CMI (concentration minimale inhibitrice) de l'antipaludique évalué. Lorsqu'elle est inférieure ou égale au seuil de résistance, la souche est dite sensible à l'antipaludique ; lorsqu'elle est supérieure à ce seuil, la souche est dite résistante.

i-3 Le semi-microtest

Il utilise des plaques pré dosées en antipaludique de 24 puits et des globules rouges parasités lavés en suspension dans le milieu RPMI additionné de 10% de sérum en vue d'une hématocrite à 5%. Chaque puits reçoit 700µl de suspension globulaire. Après 24 à 48 heures d'incubation les schizontes sont comptés en regard de 100 ou 200 parasites asexués.

L'inconvénient de ces tests de 24-26 heures réside dans le fait qu'ils ne permettent pas de tester les souches dans le cas où elles sont constituées en majorité de trophozoites jeunes qui ne disposent pas de suffisamment de temps pour donner de schizontes. Ces souches sont fréquemment rencontrées au cours de l'accès simple palustre. Cependant le semi-microtest microscopique permet dans une moindre mesure une meilleure évaluation, car pouvant permettre une croissance des trophozoites jeunes et âgés en schizontes.

ii-Les méthodes à long terme

Elles utilisent des souches de *P.falciparum* après adaptation en culture. Les parasites de culture étant asynchrones c'est-à-dire contenant des trophozoites, des schizontes et des merozoites, ces méthodes apprécient, sur frottis, l'effet de différentes concentrations d'antipaludiques sur la disparition des parasites, comparativement à un témoin (RPMI) sans antipaludique. Ces méthodes sont surtout indiquées pour les antibiotiques à action lente tels que les macrolides et les cyclines et aussi pour les inhibiteurs de la dihydrophosphate réductase. Ces derniers n'empêchent en effet pas la maturation des trophozoites en schizontes, mais empêchent la réinvasion des hématies par les merozoites.

Ces méthodes présentent un certains nombre d'inconvénients car utilisant une culture continue de *P.falciparum*. Elles sont limitées à des laboratoires spécialisés. De plus, la plus part d'entre elles nécessitent le changement du milieu de culture et de l'antipaludique toutes les 24 heures. D'autre part, les résultats obtenus avec ces méthodes doivent être interprétés avec précaution car l'adaptation en culture peut éliminer sélectivement des parasites de la population originelle et modifier ainsi la chimiosensibilité *in vitro* des isolats de *P. falciparum*.

IX-2-2-2 Les méthodes isotopiques

Elles mesurent l'effet inhibiteur de concentrations croissantes d'antipaludiques, sur l'incorporation par les parasites d'un précurseur métabolique radiomarqué, comparativement à un témoin (RPMI) et à des globules rouges sains. C'est généralement l'hypoxantine tritiée (^3H hypoxantine) qui est utilisée. Parmis les méthodes isotopiques on pourra citer : la méthode de Desjardins et collaborateur, le microtest de Druilhe et collaborateurs, le microtest de Brandicourt et collaborateurs et le semi-microtest isotopique.

i-La méthode de Desjardins et collaborateurs

C'est la première méthode décrite et l'une des plus utilisée. C'est une micro méthode semi automatique utilisant le *P. falciparum* en culture continue. Le volume final dans les puits est de 250 μl dont 200 μl d'une suspension de globules rouges parasités à 1 ,5% hématocrite dans le RPMI-sérum. La durée totale de l'incubation est de 44 à 48 heures. On détermine la dose inhibitrice 50% (DI₅₀) par une régression non linéaire.

ii-Le microtest de Druilhe et collaborateurs

Le volume final par puits est de 50 μl à 5% hématocrite. La durée d'incubation est de 48 heures .L'interprétation des résultats est basée sur la CI₅₀ qui est obtenue par une régression linéaire.

iii- Le microtest de Bandicourt et collaborateurs

C'est le microtest OMS couplé à un marquage à l' ^3H -hypoxantine. La durée totale de l'incubation en présence d' ^3H -hypoxantine est de 26 heures. Les résultats sont interprétés comme dans la méthode de Druilhe et collaborateurs. Cette méthode a l'avantage d'utiliser directement le sang parasité sans lavage préalable ; ce qui facilite son utilisation sur le terrain.

Cependant elle ne semble pas très indiquée dans les cas de souches avec de jeunes trophozoites du fait de la courte durée incubation (26 heures).

IX-3 Les tests moléculaires

Elle se base essentiellement sur la recherche d'éventuelles mutations génétiques au niveau des gènes de *Plasmodium* (gènes cibles des antipaludiques) par des techniques simples de biologie moléculaire comme la PCR. Ces mutations se localisent au niveau de plusieurs gènes et certains ont pour nom :

- PfCRT* (*Plasmodium falciparum* chloroquine resistant transporter)
- PfMSP* (*Plasmodium falciparum* merozoite surface protein)
- PfDHFR* (*Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase)
- *PfDHPS* (*Plasmodium falciparum* dihydropteroate synthase).

Généralités sur les Plantes Médicinales

DEUXIÈME PARTIE.

I- Background sur les plantes médicinales

I-1 Historique des plantes médicinales

Une plante médicinale est une plante utilisée pour ses propriétés particulières bénéfiques pour la santé humaine voire animale. Depuis la préhistoire, l’Etre humain recherche dans son environnement (plantes, animaux, pierres, esprits) de quoi soulager ses maux et traiter ses blessures. Il utilisait les plantes pour le traitement de la malaria et d’autres maladies. Guérisseurs, aînés, parents et prêtres transmettaient oralement ces connaissances, sur l’efficacité des médicaments traditionnels, aux membres de leurs familles, leurs communautés et à la génération suivante. Ainsi, au fil des millénaires, les hommes ont appris à connaître les plantes et à en cerner les vertus thérapeutiques. Plusieurs théoriciens, à diverses époques, ont entrepris de recenser les plantes médicinales et d’expliquer leur action sur l’organisme. C’est ainsi :

- 1500 ans avant J.C, le papyrus égyptien Ebers répertorie plus de 85 plantes. Les Vedas, poèmes hindous contiennent des témoignages sur les plantes (**Willcox et al, 2004**).
- 400 ans avant J.C le Charaka Samhita succède aux Vedas et décrit environ 350 plantes médicinales
- Vers 377 ans avant J.C, le grec Hippocrate, nommé “le père de la médecine” recense plantes, remèdes et traitements dont les applications restent valables jusqu’à aujourd’hui.
- En Inde, la médecine traditionnelle a été utilisée il ya plus de 5000 ans et 8000 plantes sont codifiées dans un livre nommé “Ayurveda” (**Willcox et al, 2004**).
- Il ya 5000 ans, l’Empereur chinois Shen Guen investigua les plantes médicinales et confirma leurs propriétés pharmacologiques. Cependant, 11 000 plantes médicinales sont développées et bien utilisées en Chine avant le développement de la médecine moderne. Parmi ces plantes figurent *l’A. annua*, source de l’artémisinine (**Willcox et al, 2004**).
- De 1616-1792, Nicholas Culpeper rédigera un célèbre herbier intitulé « The English Physician ou The Complet Herbal », encore réédité de nos jours

- Louis XIII fonde en 1635 à Paris le Jardin du Roy, ancêtre de l'actuel muséum national d'histoire naturelle
- En 1735, les efforts de classification des plantes aboutissent grâce à Carl Von Linné.
- Le travail des chimistes du XIXème siècle va permettre une identification plus précise des agents actifs des plantes et une meilleure définition de leurs vertus. Ils isolèrent une série impressionnante de molécules : morphine (1817), codéine (1832), acide salicylique et, dans la seconde moitié du XIXème siècle : quinine, strychnine, colchicine, cocaïne, ésérine (**Delaveau, 1982; Girre, 1985**). Les progrès de la physiologie, puis de la pharmacologie, permirent de comprendre les mécanismes d'action de ces substances naturelles. Depuis quelques années, la compréhension des relations qui existent entre la structure d'une molécule et son activité biologique permet la conception et la fabrication de médicaments synthétiques aux performances améliorées ou aux effets indésirables mieux contrôlés.
- Depuis quelques décennies, l'ère du bien être, la recherche d'une vie saine, le retour aux choses essentielles, à la nature, fait renaître un enthousiasme certain pour les plantes. La phytothérapie, médecine douce par excellence, propose des remèdes à base de plantes adaptés au mal à traiter et pouvant être prescrits sous forme de tisane, de sirop ou encore d'inhalation. Ainsi, les recherches actuelles ont confirmé la pertinence des méthodes empiriques du passé appliquées aux plantes.

D'autres peuples ont aussi utilisés les plantes médicinales depuis l'Antiquité. Parmi eux on peut citer les Grecs, les Romains, les Arabes, les Européens, les populations d'Afrique Subsaharienne et les indigènes de l'Amérique du Nord et du Sud (**Huang et al, 1992**). L'utilisation des plantes médicinales pour améliorer les conditions sanitaires des populations des pays développées, dans le but d'une meilleure accessibilité aux médicaments, a été depuis longtemps encouragée (**Akerele, 1984**). Dans les pays tropicaux endémiques, la médecine moderne n'est pas trop accessible, surtout pour les populations vivant dans les zones rurales. L'OMS indique que plus de 80% de la population mondiale utilise les plantes médicinales comme traitement de première ligne (**Farnsworth et al, 1985**). En Afrique de même qu'en Amérique du Sud et en Asie, les plantes médicinales constituent le traitement majoritaire surtout pour les populations des zones reculées (**Akubue et Mittal, 1982**). L'Organisation de l'Unité Africaine (OUA), par sa commission technique, organise à Dakar en 1968 un symposium pour discuter la contribution de la médecine traditionnelle sur la santé

humaine en Afrique. En 1978 à Alma-Ata, une conférence a été organisée par les gouvernements africains pour donner une grande priorité pour la promotion de la médecine traditionnelle et l'intégration des plantes médicinales dans la santé humaine (**Gessler, 1994**). De 2001 à 2011, l'OUA déclare cette décennie comme celle de la médecine traditionnelle (**Abuja Déclaration, 2000**).

I-2 Contribution de la médecine traditionnelle sur le développement de la médecine moderne

La médecine traditionnelle (qualifiée parfois de médecine « parallèle ») est un sujet qui touche tout le monde puisque nous sommes tous intéressés par notre santé. Nous avons probablement tous fait l'expérience de la médecine traditionnelle dès notre enfance. La médecine moderne a presque toutes les réponses aux problèmes de santé mais elle n'est pas toujours accessible et elle est souvent trop chère. De plus il est difficile pour de nombreux pays de s'approvisionner en médicaments. On estime qu'environ 80% de la population mondiale utilisent les plantes médicinales pour se soigner (**Zirihi et al, 2005**). De nombreux médicaments modernes sont fabriqués à partir des produits naturels, souvent impossible à créer chimiquement. Le quart de tous les médicaments vendus aux Etats-Unis, par exemple provient des plantes.

Les études sur l'utilisation des plantes médicinales par les populations reculées, suivies d'études phytochimiques, précliniques et cliniques, constituent une importante découverte et développement de la médecine traditionnelle. La découverte de composés naturels des plantes, comme produits actifs des médicaments, a été faite au début du 19^{ème} siècle et l'utilisation de ces produits naturels ont été d'un grand apport pour le développement de la chimie bioorganique et indirectement de la médecine moderne. La découverte de la quinine à partir de *Cinchona succiruba*, comme antimalarique, a été une aubaine pour la médecine moderne dans la lutte contre la malaria. La quinine, composé naturel, est très efficace contre la malaria et est utilisée pour les accès palustres graves. Elle a permis aussi la création de formes synthétiques, qui aussi, sont efficaces contre le paludisme.

La découverte et le développement de l'artémisinine à partir de *A. annua*, est à l'origine d'une nouvelle molécule, très efficace contre la malaria et jouant un rôle déterminant dans la lutte contre le paludisme (**Sriram et al, 2004 ; Haynes, 2006, Hsu, 2006a, Bosman et Mendis, 2007**). L'artémisinine et ses dérivés sont très actifs contre le *Plasmodium*, et constituent en combinaison avec d'autres antipaludiques, le traitement actuel contre le

paludisme. Les ACT (combinaisons à base d'artémisinine) sont actuellement considérés comme le meilleur traitement contre les accès palustres simples (**Olumnese, 2006**).

II- L'*Artemisia annua*

L'*A. annua* est une plante appartenant à la famille des Astéracées et est originaire de la Chine et d'autres pays asiatiques (Japon, Corée et Thaïlande). Elle y est utilisée depuis plus de 2000 ans dans le traitement de la malaria et d'autres maladies. Le genre *Artemisia* comprend plus de 400 espèces dont la majeure partie d'entre elles ont un goût amer (**Willcox et al, 2004**). L'*A. annua* est la seule espèce du genre *Artemisia* présentant un cycle annuel d'où le nom « *annua* ». Il ya deux grandes théories sur l'origine du nom. La première théorie vient de Ferreira et de ses collaborateurs qui pensent que le nom proviendrait de la déesse grecque « Artemis » (**Ferreira et al, 1997**). Artemis est la déesse qui guérit les maladies. Elle est aussi considérée par les grecs comme la déesse de la chasse, de la forêt et est responsable de la mort soudaine chez les femmes (**Guirand, 1959**). Par contre en ce qui concerne la seconde théorie, Bruce-Chwatt pense que le nom proviendrait d'une reine turque « Queen Artemisia » qui a vécu au quatrième siècle avant Jesus-Christ (**Bruce-Chwatt, 1982**).

II-1 L'ethnopharmacologie

L'ethnopharmacologie se définit comme l'étude scientifique interdisciplinaire de l'ensemble des matières d'origine végétale, animale ou minérale, et des savoirs ou des pratiques s'y rattachant, que les cultures vernaculaires mettent en œuvre pour modifier les états des organismes vivants, à des fins thérapeutiques, curatives, préventives, ou diagnostiques. L'intérêt considérable pour l'ethnopharmacologie ces dernières années s'expliquent par trois faits majeurs :

- La pertinence fréquente des indications thérapeutiques de remèdes vernaculaires qui a frappé les scientifiques, médecins, pharmacologues et ethnologues occidentaux,
- Les contraintes économiques : Comment trouver de nouvelles substances naturelles intéressantes dans un milieu naturel dont on sait que, pour les seuls végétaux, il contient plusieurs dizaines de milliers d'espèces, dont chacune peut produire plusieurs dizaines, voire centaines, de molécules différentes ? Comment décider du choix des espèces à étudier, sachant le coût de telles recherches ? A ces questions, l'ethnopharmacologie apporte une réponse originale, en amont de la mise au point de nouveaux produits.

- La prise de conscience au niveau mondial, à la fois de l'ampleur des problèmes sanitaires demeurés sans solution, et même de leur aggravation.

L'ethnopharmacologie peut ainsi intervenir à deux niveaux différents en y apportant des contributions originales. Dans le domaine de la connaissance, elle associe de façon nouvelle les compétences propres à diverses disciplines jusque-là éloignées les unes des autres, et ouvre la voie à l'échange de savoirs scientifiques et non scientifiques. D'un point de vue plus pratique, elle peut contribuer à l'avènement de solutions alternatives aux problèmes sanitaires des pays les plus démunis.

La comparaison du rapport coûts-efficacité de deux de ces approches, montre que le nombre d'espèces végétales présentant, *in vitro* ou *in vivo*, une activité cytotoxique ou antitumorale est multiplié par deux, lorsque les plantes sont sélectionnées sur la base de leur utilisation en médecine traditionnelle pour l'indication recherchée, en comparaison avec les résultats du screening au hasard (**OMS, 2000**).

En ce qui concerne le paludisme, où l'urgence de la diversification de l'arsenal thérapeutique est très forte, l'approche ethnopharmacologique semble être une voie alternative très intéressante. Le fait que deux antipaludiques majeurs, la quinine et l'artémisinine, soient extraits de plantes utilisées dans les médecines traditionnelles contre le paludisme renforce cette idée. Dans plusieurs pays en zone d'endémie, particulièrement en Afrique, l'instabilité des schémas thérapeutiques antipaludiques, le coût et la toxicité des médicaments antipaludiques, ont renforcé l'intérêt des populations locales pour les plantes médicinales (**Noranate et al, 2007**).

II-2 Activité antipaludique de *A. annua*

A. annua a été utilisée, comme plante médicinale pour le traitement des fièvres intermittentes, depuis 340 A.D (**Hsu, 2006b**). Cette plante connue en Chine depuis plus de 2000 ans y est communément appelée « *Qing hao* » (**De Ridder et al, 2008**). A l'origine, *A. annua* et *A. apiacea* n'étaient pas considérées comme deux espèces différentes et portaient toutes les deux le nom de « *Qing hao* » (**De Ridder et al, 2008**). La séparation fut effective en 1958 et désormais ces deux plantes distinctes portèrent le nom de « *Qing hao* » et de « *Huang hua hao* ». La première description de cette plante chinoise date de 168 avant Jesus Christ (**Efferth, 2007**). Au quatrième siècle après Jésus Christ, Ge Hong décrit une méthode de préparation de la tisane d'*A. annua* que Li Shizhen a inscrit, en 1596 dans l'encyclopédie intitulée « *Classified Materia Medica* » (**De Ridder et al, 2008**). La méthode de Ge Hong

consistait à tremper la plante fraîche dans de l'eau, ensuite essorer la plante au bout d'un certain temps de trempage et enfin le jus obtenu est utilisé comme remède (**De Ridder et al, 2008**). Le trempage suivi de l'essorage de la plante entière dans l'eau pourrait être à l'origine de l'émulsion de flavonoïdes et d'autres huiles contenus dans les tiges et dans les feuilles et qui faciliteraient l'extraction de l'artémisinine (**Hsu, 2006a**). Le taux en artémisinine à partir de la plante fraîche est 20 fois plus important que si l'extraction était faite à partir de feuilles séchées (**Wright et al, 2010**). Pendant la guerre du Vietnam (1965-1975), le gouvernement chinois initie une recherche, à partir des plantes médicinales chinoises, pour venir à bout des soldats vietnamiens. C'est ainsi que l'artémisinine fut isolé de la plante *A. annua* et constitue un élément important de la lutte contre le paludisme. Aujourd'hui, l'artémisinine et ses dérivés sont, sous forme de combinaison à base d'artémisinine (ACT), utilisés dans le traitement contre le paludisme simple. Cependant, les ACT ne sont pas accessibles pour une certaine partie de la population, poussant ainsi certaines organisations non gouvernementales (ONG) à encourager et promouvoir l'utilisation de la tisane à base d'artémisinine (**Willcox et al, 2011**). Depuis 1988, l'ONG « ANAMED (Action for Nature and Medicine) » distribue des kits (contenant des grains et leur utilisation) pour encourager la culture de la plante d'*A. annua* (**Willcox et al, 2011**). Des études cliniques préliminaires suggèrent que la plante d'*A. annua* serait efficace contre le paludisme même à des concentrations faibles d'artémisinine (**Mueller et al, 2000 et 2004**).

L'efficacité clinique de la tisane de feuilles d'*A. annua* dans le traitement du paludisme a été démontrée à l'occasion du traitement de plusieurs cas isolés, tous avec une rapide et complète amélioration clinique. Des études faites en 1986 par Chang et But, sur 105 patients infectés par *P. falciparum*, avaient montré des pourcentages de guérison de 100 % (**Chang et But, 1986**). Hirt et Lindsey, à partir d'études menées en République Démocratique du Congo, ont montré des pourcentages d'efficacité clinique de 93% sur 254 patients traités avec de la tisane d'*A. annua* après 7 jours de traitement (**Hirt et Lindsey, 2000**). L'année suivante, Hirt a mené des études, avec un long suivi sur 31 patients traité avec la tisane, et avait découvert un pourcentage de recrudescence de 13% (**Hirt, 2001**). L'efficacité de la tisane a également été étudiée dans quelques séries randomisées de la littérature : Blanke (**Blanke et al, 2008**) rapporte 10 cas traités par tisane ; Mueller (**Mueller et al, 2000, 2004**) rapporte deux séries, l'une de 53 patients, l'autre de 72 patients. Dans ces trois études, une importante amélioration clinique a été observée dans presque tous les cas dés

le troisième jour du traitement. Dans les trois études, la parasitémie a disparu dans 70% des cas au septième jour.

Cependant les auteurs ont noté une récidive de la parasitémie au 28^{ème} jour, un nombre important de cas, variant de 70% à 90% selon les séries. Ces cas de réapparition de la parasitémie, attribués à la brièveté de la demi-vie de l'artémisinine, ont été considérés comme des échecs, même en l'absence de récidive de la symptomatologie clinique. En raison de la fréquence de cette recrudescence précoce de la parasitémie, le traitement du paludisme par l'artémisinine seule ou ses dérivés, et donc à fortiori par la tisane d'*A. annua*, est considéré par l'OMS comme un traitement insuffisant, et pour cette raison le traitement de l'accès palustre par l'artémisinine est officiellement considéré comme inacceptable.

Cependant la constatation d'une parasitémie modérée sans symptomatologie clinique est classique chez l'enfant en zone d'endémie, et il est admis que cela lui apporte une immunité antitoxique et lui assure une protection minimale contre les infections ultérieures. La même parasitémie isolée notée après traitement d'un accès palustre ne paraît pas plus significative et plusieurs publications ont souligné ce fait : Mueller (**Mueller et al, 2000**) Silachamroom (**Silachamroon et al, 2001**), Swarthout (**Swarthout et al, 2006**), Whitty (**Whitty et Staedke, 2005**) ont retrouvé entre la 4^{ème} et 6^{ème} semaine une parasitémie variable de 20% à 50% selon les dérivés de l'artémisinine utilisés, isolés ou en combinaison. Au recul de 6 semaines, il est d'ailleurs difficile d'attribuer cette parasitémie à une récidive (donc à un échec du traitement) ou à une réinfestation (la distinction nécessiterait une étude génotypique du parasite). Dans l'étude très complète d'Ashley et al (**Ashley et al, 2008**) portant sur une population de 2926 enfants traités par ACT, une recrudescence de la parasitémie a été observée dans 942 cas entre le 14^{ème} et le 28^{ème} jour, attribuée à une récidive dans 12% des cas et à une réinfestation dans 78% des cas, avec un taux d'échec variant de 0% à 40%. Au total on peut considérer que la persistance ou la récidive d'une parasitémie modérée n'est pas significative dès lors qu'elle est isolée et sans symptomatologie clinique. Malgré ses imperfections, le traitement de l'accès palustre par tisane d'artémisinine peut donc être recommandé lorsqu'il n'existe pas d'alternative accessible (**De Ridder et al, 2008**), l'objectif du traitement par tisane d'artémisinine n'étant pas d'éradiquer définitivement la maladie, mais de traiter l'accès palustre et de prévenir ses complications (**Willcox et Rasoanaivo, 2004**). Pour diminuer le risque de récidive et pour éviter une monothérapie qui pourrait être l'origine de la résistance du parasite, l'OMS recommande d'associer à l'artémisinine des antipaludéens à action plus lente, et il existe actuellement plusieurs préparations pharmaceutiques,

cependant toutes trop couteuses pour un usage universel. En fait l'artémisinine contenue dans l'*A. annua* n'est pas isolée ; il s'agit d'un véritable « cocktail », composé de plusieurs molécules de flavonoïdes (scopolétine, casticine, chrysoplenetine, chrysophenol-D, cirsilineol) ; ces molécules potentialisent l'action de l'artémisinine, et d'autre part à doses plus importantes, elle semblent avoir une action directe sur le *P. falciparum* (**Elford et al, 1987** ; **Chiung-Sheue Chen Liu et al, 1992**). Le traitement par tisane n'est donc pas une véritable monothérapie et comporte un moindre risque de générer une résistance. Ceci peut d'ailleurs expliquer que le *P. falciparum* ne soit pas devenu résistant à l'artémisinine, malgré deux millénaires d'utilisation de la tisane. A l'inverse, on retrouve actuellement dans la littérature quelques publications attribuant l'échec du traitement à une résistance acquise à l'artémisinine extraite, même associée à des molécules à actions plus lente (**Ashley et al, 2008**). Des cas de résistance à l'artémisinine ont été récemment confirmés à l'Ouest du Cambodge (**Dondorp et al, 2009**). Pour compenser la brièveté de la demi-vie de l'artémisinine, la durée du traitement doit impérativement être au moins de 5 jours (**Le et al, 1999**) ; la durée habituellement recommandée est de 7 jours.

Cependant il faut noter que beaucoup d'études *in vitro*, concernant l'efficacité des plantes médicinales sur les souches de *P. falciparum*, ont été réalisées. Ces résultats ont même permis d'établir une échelle d'activité permettant d'évaluer les activités d'extraits de plante sur les modèles expérimentaux du paludisme. Il faut noter que plusieurs auteurs ont essayé de définir l'activité antipaludique de la tisane d'*A. annua*. Les deux tableaux ci-dessous constituent respectivement les méthodes d'évaluation de Sauvin en 2002 et Malebo en 2009.

Tableau II: Méthodes d'évaluation *in vitro* des plantes médicinales (Sauvin, 2002)

CI₅₀	Activité antipaludique
CI ₅₀ \square 5 µg/ml	Très bonne
5 µg/ml \square CI ₅₀ \square 10 µg/ml	Bonne
CI ₅₀ \square 10 µg/ml	Faible

Tableau III : Méthode d'évaluation *in vitro* des plantes médicinales (Malebo et al, 2009)

CI ₅₀	Activité antipaludique
CI ₅₀ \square 0,5 µg/ml	Forte activité
0,5 \leq CI ₅₀ \square 5µg/ml	Activité modérée
5µg/ml \leq CI ₅₀ \square 10µg/ml	Activité légère
CI ₅₀ \geq 10µg/ml	Inaktivité

II-3 Recommandations de traitement

L'efficacité de la tisane d'*A. annua*, contre le paludisme et les autres maladies, a été démontrée depuis longtemps. De nos jours des études cliniques faites, ont montré que la tisane d'*A. annua*, peut être efficace sur le paludisme à *P. falciparum* avec des pourcentages de 70 à 100 % (**Chang et But, 1986 ; Hirt et Lindsey, 2000 ; Mueller et al ; 2000, 2004**). Ceci a poussé beaucoup d'ONG de promouvoir la culture et l'utilisation de l'*A. annua* dans la lutte contre le paludisme (**Willcox et al, 2011**). Cependant, il ya eu beaucoup de débats concernant l'appropriation, l'efficacité et la sécurité de ce programme (**Willcox, 2009**). Certains pensent qu'il est très compliqué, d'apprendre aux villageois, comment cultiver et utiliser cette plante, pour prendre en charge son propre traitement contre le paludisme (**Willcox et al, 2011**). D'autres ont la peur de voir surgir des résistances à cause de mauvaises pratiques mais aussi des faibles doses d'artémisinine contenues dans la tisane *d'A. annua* (**Jansen, 2006**).

Inversement, certaines ONG pensent que ce traitement est le seul moyen de recours dans certaines zones très reculées où il ya un manque de services de santé et l'inaccessibilité aux médicaments (**Willcox et al, 2011**). En plus ces ONG arguent que la tisane *d'A. annua*

contient plusieurs autres composés antipaludiques qui peuvent agir en synergie avec l'artémisinine, d'où l'efficacité accrue de la plante et l'absence de résistance (**Liu et al, 1992 ; Elford et al, 1987**). Ainsi ils ont entrepris l'utilisation et la culture de la plante *A. annua* pour la lutte contre le paludisme. Parmi eux on peut citer l'ANAMED (Action for Nature and Medicin) qui fait la promotion de l'utilisation de la médecine traditionnelle (**Willcox et al, 2004**). Celle-ci distribue des semences et des variétés d'armoises riches en artémisinine (**Delabays, 1997**) pour la culture et enfin l'utilisation comme antipaludique. L'ANAMED travaille avec près de 240 organisations dans le monde, profitant ainsi de leur expérience (**Willcox et al, 2004**). Ces collaborations, tant sur le plan expérimental et scientifique, ont permis à l'ANAMED de formuler des recommandations. Des recommandations, basées sur des études menées par Hirt en 2001, qui ont été formulées et diffusées dans le monde. Ces recommandations consistent à des infusions des feuilles séchées d'*A.annua* proportionnelles au poids du patient (**Hirt et al, 2001**). Les recommandations de Hirt sont :

- Pour un adulte de 60 kg, infusion de 5g de feuilles séchées dans 1 litre d'eau et laisser refroidir pendant 15 minutes avant de filtrer pour ensuite récupérer le jus
- Pour un enfant de 30 kg, on a la même procédure mais ici la quantité de feuilles séchées infusées est de 2,5 g
- Pour un enfant de 15 kg, on a une infusion de 1,25 g de feuilles séchées

Hirt, démontre que cette méthode permet d'extraire 55% d'artémisinine dont 35 à 45 % proviennent des feuilles (**Hirt et al, 2001**). Hirt suggère que l'infusion donne plus de rendement d'extraction que la décoction où 50 % du taux en artémisinine sont perdus. Toute fois des études ont montré que des infusions de feuilles séchées d'*A. annua* dans du lait donnent encore des pourcentages d'artémisinine encore plus considérables de l'ordre de 80 % (**De Magalhaes et al, 2003**). A cause de la réactivité de l'artémisinine avec les ions de fer, l'ANAMED préconise d'utiliser des bocaux mais qui ne sont pas en fer.

Concernant la posologie de traitement, l'ANAMED préconise des prises de 250 ml de tisane d'*A. annua*, toutes les six heures pendant une durée de 7 jours. Cette posologie est basée sur la pharmacopée Chinoise qui recommande des doses quotidienne de 4,5 à 9 grammes (**Willcox et al, 2004**).

II-4 Aspect botanique

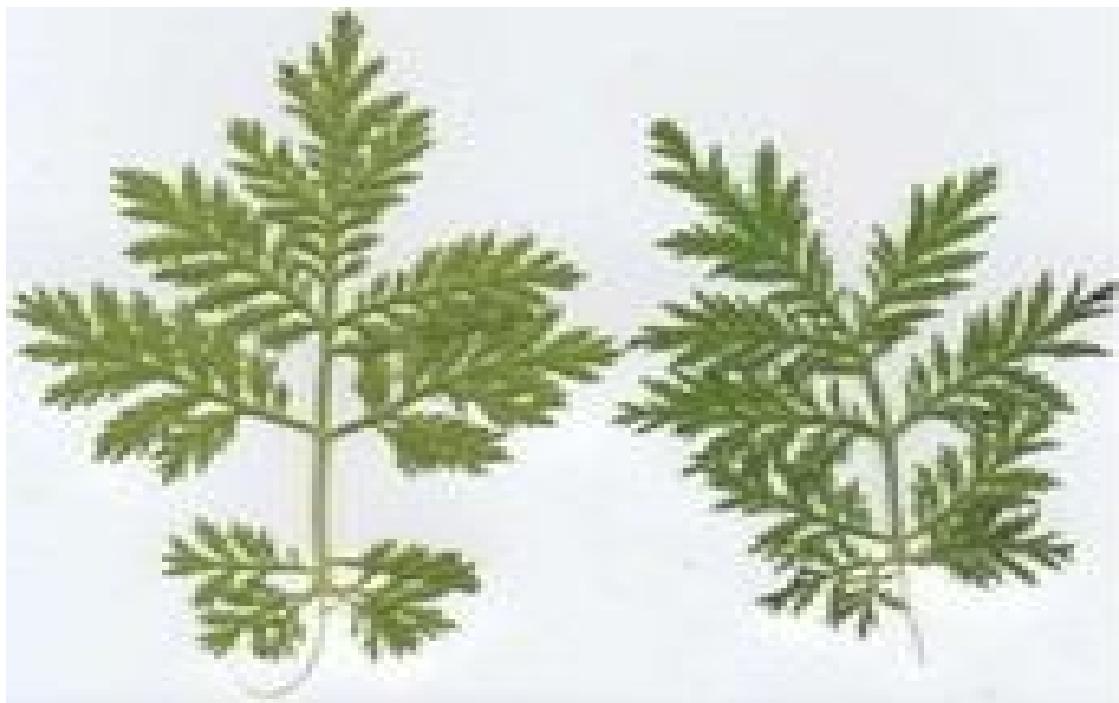


Figure 5 : Plante d'*Artemisia annua*

www.botica-casera.com/2013/04/artemisia-annua-m

Étant donné le nombre considérable de végétaux supérieurs plus de 250000 dans le monde, il est nécessaire d'avoir un système de classification à la fois simple et rationnel. Encore faut-il, au préalable, pouvoir désigner toute espèce végétale, d'une façon claire, précise et identique pour tous.

La nomenclature botanique est la discipline de droit botanique qui a pour objet de définir et d'édicter les règles permettant de former les noms de taxons des organismes «considérés comme plantes», et de déterminer leur priorité en cas de concurrence. Ces règles sont édictées par un document mis à jour tous les six ans, le Code international de nomenclature botanique (CINB), qui est la traduction française (non officielle) de l'International Code of Botanical Nomenclature (ICBN).

D'une manière générale, les plantes peuvent être classées en 3 catégories:

- les plantes aliments ou plantes comestibles et qui représentent une part très importante de la ration alimentaire de l'Homme et des animaux herbivores.
- les plantes médicinales; ce sont les espèces botaniques utilisées en phytothérapie et médecine populaire pour guérir certaines affections chez l'Homme et les animaux.
- les plantes poisons ou plantes toxiques ; ce sont les plantes qui peuvent entraîner des accidents toxicologiques chez les individus qui les ingèrent.

L'*A. annua* est une plante médicinales dont les tiges, très ramifiées, ont une longueur comprise entre 30 et 100 cm (pouvant atteindre plus de 3 m en culture). La systématique de cette plante s'établit comme suit :

- Règne : *Plantae*
- Sous-règne : *Tracheobionta*
- Division : *Magnoliophyta*
- Classe : *Magnoliopsida*
- Sous-classe : *Asteridae*
- Ordre : *Asterales*
- Famille : *Astéracées*
- Genre : *Artemisia*
- Espèce : *Artemisia annua*

Les Astéracées constituent la deuxième famille, de plante à fleur, la plus représentée en espèces. Le genre *Artemisia*, extrêmement large, est composé de 200 à 400 espèces qui sont des herbes et arbustes (**De Ridder et al, 2008**). *A. annua* est un arbuste annuel qui peut atteindre 50 à 150 cm de hauteur en milieu naturel mais en culture elle peut dépasser 3 mètres. C'est une plante cultivée dans les climats tempérés. Elle est très répandue en Chine, au Vietnam, mais elle est aussi cultivée en Afrique de l'Est, aux Etats-Unis, en Russie, en Inde aux Brésil et d'autres pays dans le monde (**Bhakuni et al, 1988, 1990**). La reproduction de la plante est assurée par des insectes pollinisateurs (**Bown et al, 1995**).

La floraison est estivale. On la trouve dans tous les terrains vagues (y compris au milieu des habitations) des zones tempérées très chaudes.

II-5 Culture de l'*A. annua*

L'*A. annua*, une espèce de la famille des composées, est une armoise annuelle qui peut atteindre plus de 3 m de haut en culture. Sa répartition naturelle s'étend à l'ensemble des

zones tempérées chaudes. Cette plante n'est pas seulement native de la Chine mais aussi du Japon, Corée, Vietnam, Myanmar, Nord de l'Inde et au Sud de la Sibérie jusqu'en Europe de l'Est (**OMS, 1998**). Elle a été introduite aussi dans beaucoup de pays, en Europe, en Amérique du Nord et dans les Tropiques (**Laughlin et al, 2002**).

Les minuscules graines germent très bien quand elles sont cultivées dans des sols bien aérés (**Hirt et Lindsey, 2000**). Dans les terres lourdes la plante peut être cultivée dans des serres. La préparation du sol consiste à un labour, puis un fraisage ou un hersage. A cause de la taille extrêmement réduite des semences (12 000 graines au gramme), le semis direct est délicat. Les semis sont réalisés dans des plates-bandes protégées de la pluie et du soleil direct (compter 20 à 25 m² de surface pour les 5 grammes de graines nécessaires à la préparation des plantules destinées à un hectare de culture). Les graines sont mélangées à du sable ou de la cendre (1 kg de sable pour 5 g de graines), déposées en surface de la plate-bande, puis saupoudrées de terreau tamisé et/ou de sable, ceci plus pour stabiliser les graines que pour véritablement les recouvrir. Il convient ensuite de maintenir les semis bien humides, sans excès toute fois. Des températures nocturnes de 16-18°C et diurnes de 23-25°C sont optimales. La germination a généralement lieu dans la semaine qui suit. Un repiquage dans des petites mottes de terreau compressé est effectué 3-4 semaines plus tard, lorsque les plantules atteignent le stade 2-3 paires de feuilles (3-4 cm de haut avec des racines bien formées (4-5 cm). La plantation au champ à lieu 3 semaines plus tard lorsque les plantes ont atteint la taille d'environ 15 cm.

La plante a un développement remarquable et la culture recouvre donc rapidement le sol. Cependant 1 ou 2 désherbages peuvent s'avérer nécessaires dans les premières semaines. Le facteur critique pour maximiser le rendement en artémisinine est la culture en jour long parce que dans les régions de hautes altitudes, la plante pousse mieux dans les longs jours d'été (**Willcox et al, 2004**). Les jours courts d'été peuvent initier des floraisons précoces avec une diminution du rendement en artémisinine (**Willcox et al, 2004**). Dans les tropiques, les jours courts sont à l'origine des floraisons précoces, conséquence, une diminution de la biomasse. Toute fois, le rendement peut être optimisé dans les hautes altitudes avec des variétés dont la floraison est retardée (**Laughlin et al, 2002**). Tout ceci est possible artificiellement en créant des jours avec des éclairements de plus de 13,5 heures (**Ferreira et al, 1995a**).

La récolte des feuilles doit se faire dès le bourgeonnement des fleurs, avant la pleine floraison. Le moment de la récolte est très important à déterminer, car la concentration en artémisinine est maximum au moment du bourgeonnement et décroît rapidement après la

floraison. La récolte se fait habituellement de 5 à 7 mois après la plantation, mais au plus tard lors de la formation des boutons, car en zone tropicale, la teneur en artémisinine baisse fortement et très rapidement lors de la floraison.

Chez les formes sauvages, la concentration maximale en artémisinine est obtenue avant les périodes de floraison sur toutes les parties de la plante à l'exception des graines (**Ferreira et al, 1997**). Mais la molécule recherchée est présente exclusivement dans les feuilles, il convient donc de séparer ces dernières avec les tiges. La cueillette peut se réaliser, d'une part, en pinçant une extrémité des rameaux entre le pouce et l'index, puis en remontant le long de la tige pour arracher les feuilles. Cette méthode a l'avantage de donner du matériel très propre et de résoudre le problème de la séparation ultérieure des feuilles et des tiges. De plus, il donne un matériel facile à sécher (2-3 jours dans une atmosphère sèche et aérée) et d'un volume minimal. D'autre part la cueillette peut se faire en coupant et rassemblant les plants, puis en les étalant sur un tissu pour le séchage. La concentration en artémisinine est très importante dans les feuilles sèches, notamment en cas de récolte précoce (**Le et al, 1999**). Lorsque la plante est sèche (environ 3-4 jours sont nécessaires) il faut détacher les feuilles des tiges car seules les feuilles contiennent le principe actif. Ceci peut se faire en frappant les plants contre une surface dure, ou mieux encore en empaumant les plants à leur base et arrachant les feuilles en remontant la main de bas en haut le long de la tige. Ces techniques ont l'inconvénient de fragmenter les feuilles en fines particules. On peut piler les feuilles jusqu'à obtention d'une poudre fine que l'on peut conserver dans des récipients ou sacs en plastique opaques.

Dans les variétés riches en artémisinine, la concentration maximale en artémisinine est obtenue au début de la saison de floraison. Ceci permettrait de penser que le soleil et les températures infernales réduisent la quantité d'artémisinine (**Laughlin et al, 2002**). Ferreira et ses collaborateurs évaluent 23 clones d'*A. annua* avec des taux d'artémisinine qui varient entre 0,001 à 0,35%, cultivées en serre sous les conditions naturelles (**Ferreira et al, 1995b**). Après séchage, il faut stocker les feuilles dans des sacs à tissu opaque dans un endroit frais et à l'ombre. Il peut être difficile de déterminer précisément la phase de transition entre les feuilles et la floraison, car les feuilles ont tendance à disparaître au moment du bourgeonnement ; de plus les fleurs sont de très petite taille, avec une coloration jaunâtre, et il peut être délicat de les différencier de petites feuilles.

II-6 Préparation de la tisane d'*A. annua*

L'*A. annua* est utilisée pour lutter contre les fièvres et les coups de froid dans la Médecine Traditionnelle Chinoise (**De Ridder et al, 2008**). Elle y est aussi recommandée comme supplément à l'alimentation à cause de sa propriété à augmenter la longévité (**Blanke et al, 2008**). Les cultures locales de l'*A. annua* peuvent augmenter l'accessibilité à cet antipaludique et à pour conséquence la diminution de la mortalité palustre due à *P. falciparum* (**De Ridder et al, 2008**). Le traitement du paludisme, par l'*A. annua*, se fait par une tisane avec différentes méthodes de préparation. Parmi les méthodes décrites, nous pouvons citer entre autres, celles décrites par Mueller en 2000 et Rath en 2004.

II-6-1 Méthode de Mueller et al, 2000

En 2000, Mueller établit deux méthodes de préparation distinctes sur le même hybride d'*A. annua cv. Artemis*, durant toute l'expérimentation. Cette espèce est cultivée dans des conditions locales en République Démocratique du Congo. Après la moisson, les feuilles obtenues sont séchées à partir desquelles une tisane est préparée selon deux méthodes suivantes :

- Méthode A : Elle consiste d'abord à ajouter 1 litre d'eau chaude sur 5 g de feuilles séchées. Ensuite après avoir remué brièvement, le mélange est refroidi pendant 15 minutes et enfin, filtré pour séparer la tisane des feuilles.
- Méthode B : Elle consiste à ajouter 5 g de feuilles séchées dans 1 litre d'eau et chauffer jusqu'à ébullition. Le mélange est laissé bouilli pendant 5 minutes et après filtrer

Tableau IV : Résultats d'extraction (Mueller et al, 2000)

Quantité de feuilles séchées (g)	Méthode d'extraction (A ou B)	Concentration d'artémisinine dans la tisane (mg/l)	Pourcentage d'extraction (%)
5	A	12	41,4

5	B	7,2	24,8
---	---	-----	------

D'après le tableau de Mueller, on observe que pour la même quantité de feuilles séchées *d'A. annua* (5 g), le pourcentage d'extraction est plus important avec la méthode A que pour la méthode B. Donc on peut tirer comme conclusion, la méthode A est meilleure que la méthode B.

II-6-2 Méthode de Rath et al, 2004

En 2004, Rath établit trois méthodes de préparation de la tisane *d'A. annua cv. Artemis*. Cette espèce est cultivée, dans des conditions bien contrôlées, en Allemagne. Après moisson, les feuilles sont séchées et Rath a utilisé 5 g pour les expérimentations décrites ci-dessous :

- Méthode A : Elle consiste à ajouter de l'eau chaude sur les feuilles séchées. Le mélange est laissé refroidi à température ambiante puis filtré en séparant les feuilles de la tisane
- Méthode B : les feuilles séchées sont chauffées pendant 30 mn, puis le mélange laissé refroidir à température ambiante et enfin filtré pour enlever les feuilles
- Méthode C : Après ajout d'eau chaude sur les feuilles séchées, le mélange est remué brièvement et couvert pendant 10 mn. Ensuite les feuilles sont enlevées par filtration et pressées pour récupérer la tisane résiduelle. Enfin, la tisane obtenue est laissée refroidie à température ambiante.

Tableau V : Résultats d'extraction (Rath et al, 2004)

Méthodes d'extraction (A, B, C)	Quantité de feuilles séchées (g)	Concentration d'artémisinine dans la tisane (mg/l)	Pourcentage d'extraction (%)
A	5	57,5	83
B	5	36,5	53
C	5	60	86

Le tableau ci-dessus montre les pourcentages d'artémisinine obtenus à partir de trois méthodes d'extraction. La méthode C donne la plus grande concentration en artémisinine (60 mg d'artémisinine pour 1 litre de tisane) correspondant à un pourcentage d'extraction de 86%, pour 5 g de feuilles séchées. Donc d'après Rath, la méthode C est la meilleure méthode d'extraction. Par contre, la méthode B est la plus mauvaise à cause de la chaleur qui détruit l'artémisinine qui est thermolabile.

En comparant la méthode de Mueller avec celle de Rath, pour 5 g de feuilles séchées on a respectivement des pourcentages d'extraction de 41,4% et 86%. Donc la méthode de Rath est meilleure que celle de Mueller. Mais cependant il ya deux différences, sur les deux méthodes, qui pourraient expliquer ces résultats obtenus :

- Premièrement, la culture des deux hybrides s'est faite dans deux lieux différents (RDC et Allemagne)
- Deuxièmement, les feuilles sont récoltées de différentes façons. Dans la méthode de Rath, la plante entière est récoltée et séchée alors que dans celle de Mueller, seules les feuilles sont récoltées et coupées.

II-7 Composantes de l'*Artemisia annua* : Propriétés et importances

Les plantes médicinales fournies près de 80% des médicaments utilisés dans le monde (**Koche, 2011**). Elles constituent d'importantes sources d'éléments biologiques qui peuvent jouer un rôle thérapeutique très important (**Darinka et al, 2011**). La recherche sur différentes plantes montre qu'elles sont composées de plusieurs substances. L'*A. annua* contient plusieurs composés bioactifs y compris les flavonoïdes, les coumarines, les stéroïdes, les composés phénoliques, les purines, les lipides, les composés aliphatiques, les terpеноïdes (**Brisibe et al, 2009**). Dans cette thèse, nous allons développer les propriétés et l'importance de quelques composés à savoir : les terpеноïdes, les composés phénoliques et les éléments minéraux de la tisane.

II-7-1 Les terpénoides

Les terpénoides sont des métabolites secondaires (ou produits naturels des plantes), ils sont différents selon les espèces. Les terpénoïdes ou isoprénoïdes constituent une classe de substances naturelles extrêmement abondante. Plus de 22 000 composés ont été répertoriés (Connoly et Hill, 1992). Leur squelette carboné est formellement dérivé du squelette ramifié en C5 de l'isoprène. Les premiers membres du groupe ont été isolés de la térebenthine (terpentin). Ils sont aussi appelés isoprénoides car leur dégradation thermique libère le gaz isoprène. Ils sont répartis dans différentes classes en fonction du nombre d'unités isopréniques qu'ils contiennent. Les terpénoides ont des activités aussi bien chez le vecteur que chez le parasite. Les plantes de la famille des Astéracées, dont l'*A. annua*, contiennent de nombreux composés terpénoïques qui ont des actions contre les moustiques (Willcox et al, 2004). En plus de l'action répulsive contre les moustiques, les terpénoides peuvent avoir des actions antimalariques qui sont bien démontrées. On distingue ainsi les hémiterpènes (C5), les monoterpènes (C10), les sesquiterpènes (C15), les diterpènes (20), les sesterterpènes (C25), les triterpènes (C30), les tétraterpènes (C40) et les polyterpènes (C5n). Dans le cadre de notre travail, seulement les sesquiterpènes et les monoterpènes seront développés.

II-7-1-1 Les monoterpènes : Camphre

Concernant les monoterpènes, 28 ont été retrouvées dans des localités différentes et à différents niveaux de la plante. Nous avons Chrysosplénol, eupatorin....Parmi les monoterpènes, le plus important est le camphre.

Le camphre est un composé organique bicyclique solide issu du camphrier. Le camphre a pour formule chimique $C_{10}H_{16}O$. Le camphre est récupéré par distillation de morceaux de racines, de tiges ou d'écorces du camphrier. Il existe aussi de nombreuses méthodes pour synthétiser le camphre. L'une d'entre elle a pour point de départ l'essence de térebenthine ou pinène $C_{10}H_{16}$. Berthelot synthétise le camphre par oxydation du bornéol $C_{10}H_{18}O$ ou du camphène $C_{10}H_{16}$. Le camphre est un poison lorsqu'il est ingéré en grandes quantités. Le camphre est un anaphrodisiaque. Le camphre a été utilisé contre l'épidémie du choléra en 1831-1832 puis contre la grippe asiatique en 1957-1958. Le camphre est également un insecticide (moustiques), il est notamment efficace contre les mites. Le camphre a des propriétés tensioactives.

II-7-1-2 Les sesquiterpènes : l'artémisinine

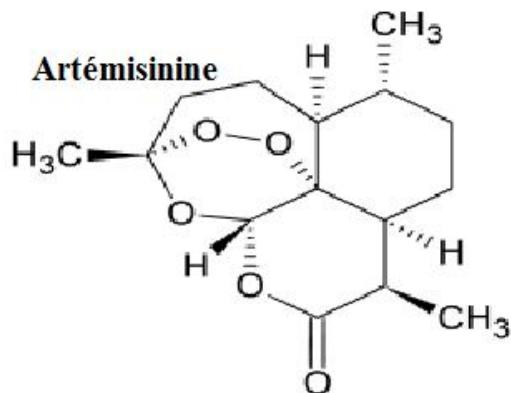


Figure 6 : la structure chimique de l'artémisinine

Trente sesquiterpènes ont été trouvées avec des pourcentages différents selon le niveau dans l'arbre et le pays. Parmi ces sesquiterpènes, on peut citer entre autres : acide absicique, acide artémisinique, artéannuin A à N, Artémisinine, dihydroartémisinine, Artemisinol..... Le plus connu des sesquiterpènes est l'artémisinine.

L'artémisinine est un sesquiterpène lactone contenant un groupe peroxyde, qui semble être responsable de l'activité antipaludique de l'*A. annua* (Willcox *et al*, 2004). L'artémisinine est présente dans plusieurs parties de la plante. Cependant, la préparation contenant les feuilles entières de la plante ont probablement des rendements plus élevés en artémisinine que les filtrats d'infusion et de décoction, car la plus grande partie de l'artémisinine de la plante provient des feuilles (Willcox *et al*, 2004). Le rendement d'extraction de l'artémisinine à partir de l'armoise peut varier d'un facteur 10 ou 20 selon la région de culture, ce qui rend son approvisionnement aléatoire. Par ailleurs, la synthèse totale de l'artémisinine est trop couteuse pour être envisagée de façon industrielle. L'artémisinine et ses dérivés ont des actions sur les gamétoctyes de *P. falciparum* et réduisent la transmission du paludisme (Price *et al*, 1996).

i- Les sources d'artémisinine

Excepté *l'A. annua*, l'artémisinine est aussi trouvé dans d'autres armoises comme *A. apiacea Hance* et *A. lancea Vaniot* mais à de faible quantité (**Hsu, 2006a**). Les principaux composés relatifs à l'artémisinine trouvés dans *l'A. annua* sont arteannuin B et acide artémisinique (**De Ridder et al, 2008**). Plus de 42% de l'artémisinine dans la plante se trouvent dans les feuilles où elle est accumulée dans les trichomes glandulaires (**Bhakuni et al, 1988, 1990**). Le pourcentage total d'artémisinine extrait dans les différentes variétés d'armoises, est compris entre 0,01 et 1,4% au niveau des feuilles séchées (**Delabays et al, 2001**). Cette variabilité peut être, d'une part, expliquée par les différentes méthodes d'extraction, les différentes périodes de collection mais aussi de différentes influences environnementales (**De Ridder et al, 2008**). D'autre part, cette variabilité peut être expliquée par les différentes méthodes de quantification de l'artémisinine. La concentration de l'artémisinine au niveau des feuilles est variable en fonction de la position des feuilles. Elle est plus importante au niveau des feuilles supérieures (jeunes feuilles) qu'au niveau des feuilles du milieu ou du bas (feuilles âgées) (**Delabays et al, 2001**). La concentration d'artémisinine dans la plante varie aussi en fonction des saisons de collection. Cependant, elle est plus importante si la récolte se fait juste avant la floraison (**Liu et al, 2006**). Les variations génétiques aussi peuvent influencer sur la variabilité du taux d'artémisinine.

ii- L'artémisinine et ses dérivés et les associations à base d'artémisinine (ACT)

L'artémisinine pure a une faible solubilité dans l'eau et dans les huiles (**Aston et al, 1998**). L'artémisinine peut, cependant, être administrée par voie orale, rectale mais aussi intramusculaire (**Barradell et Fitton, 1995**). Malheureusement, l'administration par voie orale n'est pas souvent possible chez les patients atteints de paludisme sévère, à cause des vomissements répétés (**De Ridder et al, 2008**). Pour résoudre ce problème, plusieurs formes semi-synthétiques ont été développées (**Golenser et al, 2006**). Parmi ces dérivés synthétiques, nous avons la forme soluble dans l'eau (artésunate) et celle soluble dans les huiles (artéméther et arteether).

L'artésunate (Arsumax) est un dérivé hydrosoluble de l'artémisinine. Son association avec la méfloquine reste très active contre les souches *P. falciparum*, même les plus résistantes (**Luxemburger et al, 1994**). Son activité prooxydante a été démontrée par Arreesrisom et al (**Arreesrisom et al, 2007**).

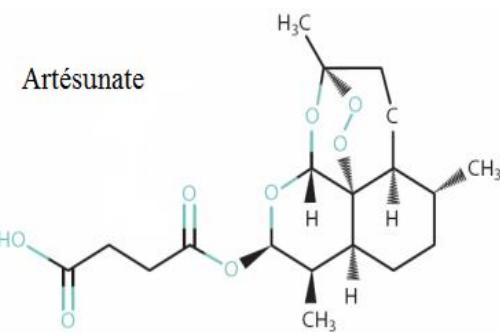


Figure 7 : Structure chimique de l'artésunate

L'artéméthér (Paluther) est un dérivé liposoluble de l'artémisinine (**Benoit-Vical, 2000**). De nos jours l'utilisation de l'artéméthér en association est très fréquente (**Hoffman, 1996**). En effet il est plus efficace que la quinine, même dans le traitement du paludisme grave (**Huda et al, 2003**). Il est indiqué dans le traitement de l'accès palustre grave à *P. falciparum* multirésistant (**Huda et al, 2003**).

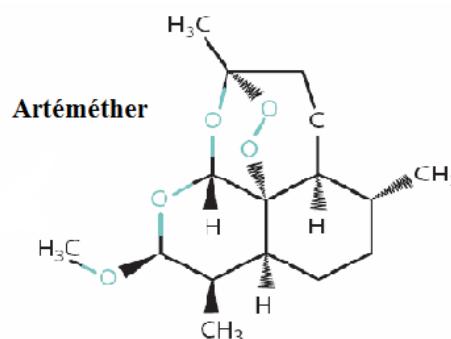


Figure 8 : Structure chimique de l'artéméthér

L'artééther est un dérivé éthyléther de l'artémisinine. Il a des propriétés semblables à celles de l'artéméthér et est conseillé dans le traitement du paludisme grave à *P. falciparum*.

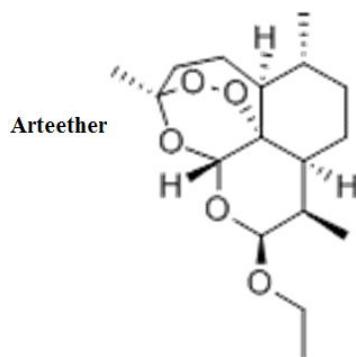


Figure 9 : Structure chimique de l'artééther

Les composés relatifs à l'artémisinine trouvés dans l'*A. annua* sont arteannuin B et acide artémisinique. Ce dernier est très important car il constitue le précurseur de l'artémisinine lors de la biotransformation de même que pendant le développement des formes semi-synthétiques (**Mueller et al, 2000** ; **Kim et Sasaki, 2004** ; **Lapkin et al, 2006**). L'artémisinine est transformée en dihydroartémisinine (DHA) suite à la réduction du groupement carbonyl (**Cui et Su, 2009**).

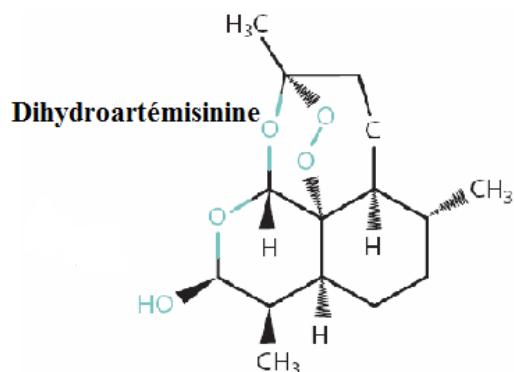


Figure 10 : Structure chimique du dihydroartémisinine

Cependant la forme commerciale de l'artémisinine est obtenue seulement à partir de l'*A. annua* et son pourcentage dépend des conditions de culture de la plante (**Kuhn et Wang, 2008**). L'*A. annua* a des vertus connues en Chine depuis plus de 2000 ans mais elle n'a été étudiée en Occident qu'à partir des années 1970 et introduite dans la pharmacopée antipaludique à la fin de la décennie. Il a pourtant fallu attendre le début des années 1990, et les graves problèmes de chloroquine-résistance, pour qu'elle soit utilisée hors de Chine (**Pradines et al, 2010**). En 2001, l'OMS considérait que l'artémisinine est le plus grand espoir mondial contre le paludisme. Elle agit très rapidement avec une concentration maximale par voie orale en moins de 2 heures et une demi-vie inférieure à 1 heure (**Pradines et al, 2010**). Mais elle ne permet pas d'éliminer complètement tous les parasites d'où la nécessité de l'associer à d'autres antipaludiques (ACT). Depuis 2001, plus de 60 pays ont adopté officiellement les ACT en traitement de première ligne (**Nosten et White, 2007 ; Eastman et Fidock, 2009**). L'utilisation des ACT s'est accompagnée d'une diminution drastique de la transmission, de la morbidité et de la mortalité palustres dans de nombreuses zones d'endémie (**OMS, 2008 ; Nyarango et al, 2006**). L'artémisinine ou ses dérivés entraînent une disparition

de la fièvre et de la parasitémie plus rapidement que tout autre antipaludique connu (chez 90% des malades la parasitémie disparaît dans les 48 heures), et ne provoque que d'effets secondaires (**Pradines et al, 2010**). Elle est efficace sur tous les stades parasitaires et peut réduire jusqu'à 10 000 parasites par cycle (**Woodrow et al, 2005 ; White, 2008**). Actuellement, la cinchona (quinine et quinidine) et l'artémisinine sont les deux composés utilisés pour lutter contre le paludisme sévère (**Pasvol, 2005**). Plusieurs études cliniques sur l'efficacité de ces deux composés contre la malaria, ont montré que l'artémisinine est plus performante que la quinine (**White, 2008 ; McIntosh et Olliaro, 2000 ; Group SEAQAMT. 2005**). L'intérêt des combinaisons à base d'artémisinine (ACT) est que la chance que les parasites développent une résistance aux deux molécules est moins probable que dans le cas d'une seule molécule (**White, 1999 ; Nosten et White, 2007**).

Mais, les premiers cas d'échec cliniques aux ACT ont été identifiés en Asie du Sud-est (**Noedl et al, 2008 ; Dondorp et al, 2009**). En Afrique Centrale, une monothérapie à base d'artésunate est accompagnée de pourcentages de recrudescence de 5 à 15% avec respectivement des durées de traitement de 28 à 42 jours (**Cui et Su, 2009**). C'est une des raisons pour laquelle, les associations à base d'artémisinine sont recommandées dans les traitements contre la malaria (**Ashey et White, 2005 ; Davis et al, 2005**). Différentes associations sont commercialisées (artésunate-sulfadoxine-pyriméthamine, artésunate-amodiaquine, artéméther-luméfantrine, artésunate mésfloquine, artésunate-chloroprogua-nil-dapsone, artésunate-atovaquone-proguanil, dihydroartémisinine-piperaquine (Artekin), artésunate-pyronaridine) (**Pradines et al, 2010**). Au Sénégal les combinaisons à base d'artémisinine qui ont été choisies comme traitement de première intention contre les accès palustres simples sont : artéméther-luméfantrine (COARTEM^R) et artésunate-amodiaquine. L'association artéméther-luméfantrine est mieux tolérée que l'association artésunate-mésfloquine pour le traitement des infections à *P. falciparum* polypharmacorésistant lorsqu'elle est administrée à raison de six doses pendant trois jours. Cependant cette association n'est pas recommandée chez la femme enceinte ou les femmes allaitantes étant donné que son innocuité n'a pas été établie dans ces circonstances. L'association artésunate-amodiaquine se révèle être une option valable, notamment dans les zones où l'efficacité de la chloroquine est déjà compromise. Toute fois, il faudrait continuer à suivre l'évolution de la résistance à l'amodiaquine et surveiller l'impact de la résistance à cette molécule sur l'efficacité de l'association (**OMS, 2001**).

iii-Mécanisme d'action de l'artémisinine

La structure chimique de l'artémisinine a été déterminée en 1979. C'est un sesquiterpène lactone avec un pont peroxyde (pont reliant deux atomes d'oxygène). C'est une molécule à haute énergie, prompte à réagir et à perdre son énergie car peu stable (**Jansen et al, 2007**). La durée de conservation de l'artémisinine en tisane est brève et son efficacité diminue rapidement après l'infusion des feuilles, surtout quand elle est conservée à température ambiante (**Houzé et al, 2007**). Il faut donc utiliser de la tisane fraîchement préparée. L'artémisinine a un rôle anti-inflammatoire et antipyrrétique ; elle est active non seulement sur le *P. falciparum*, mais également sur de nombreuses bactéries et virus (**Lutgen et Michels, 2008**) et elle semble avoir un rôle dans le freinage de la prolifération cellulaire cancéreuse. Dans le cas du paludisme, l'artémisinine est active sur les tropohozoites jeunes (**Agtmael, 1999**) et évite l'évolution vers les stades de tropohozoites plus tardifs, où le parasite adhère à l'endothélium vasculaire ; ce phénomène est appelé séquestration et il se produit dans les microvaisseaux des organes vitaux et notamment du cerveau. Ce stade de séquestration est considéré comme responsable des complications de l'accès palustre et notamment du neuropaludisme, avec adhérence des hématies parasitées à la paroi des veinules postcapillaires du cerveau, inflammation et hémorragies autour des vaisseaux, le coma étant dû à l'accumulation dans les capillaires cérébraux d'un grand nombre d'hématies parasitées, responsables des troubles métaboliques par production de toxines. L'artémisinine pénètre dans les globules rouges parasités et stoppe précocement la maturation des schizontes. Elle a également un effet gamétoцитocides qui diminue le risque de transmission de l'infection.

Le mode d'action de l'artémisinine reste encore incomplètement connu. Plusieurs mécanismes semblent s'associer (**Golenser et al, 2006**). L'efficacité des quinoléines est due d'une part par leur basicité permettant ainsi leur accumulation dans la vacuole digestive acide du parasite (**Willcox et al, 2004**). Par contre l'artémisinine déroge à ce mécanisme du fait de sa neutralité (**Willcox et al, 2004**).

Actuellement il a été admis qu'il existe deux modes d'action de l'artémisinine et de ses dérivés. Le premier consiste à l'interaction de l'artémisinine avec l'hème et le second, perturbation dans le métabolisme des protéines du parasite.

- Interaction de l'artémisinine avec l'hème : l'importance du pont peroxyde dans la molécule d'artémisinine a été très bien démontrée à partir du désoxyartémisinine, constituant de *l'A. annua* qui a un seul oxygène à la place du pont. Depuis il a été bien connu que les

peroxydes réagissent avec le fer pour donner des radicaux libres (**Halliwell et Gutteridge, 1989**). Durant l'infection, plus de 70% de l'hémoglobine est digérée par le parasite avec libération de l'hème. L'hème est un cofacteur contenant un atome de fer. Il existe trois types d'hème biologiquement importants, mais le plus commun est l'hème b. Il provient de la digestion de l'hémoglobine par le plasmodium. L'hème libre étant toxique, le parasite va le transformer, par cristallisation, en un produit inerte appelé hémozoïne. L'hémozoïne est encore appelée pigment malarique ou pigment lacustre. Elle circule dans l'organisme et finit par atteindre l'hypothalamus dont elle perturbe son fonctionnement. Elle est aussi responsable des très fortes fièvres qui accompagnent la malaria. Donc l'hème ou le fer vont activer la rupture du pont endopéroxyde de la molécule d'artémisinine. Il faut signaler que l'artémisinine ne réagit pas avec l'hémoglobine des globules rouges sains mais plutôt avec l'hème (**Hong et al, 1994**). Ceci explique la sélectivité de l'artémisinine sur les globules rouges infectés et pourquoi elle attaque les formes parasitaires sanguines tout en épargnant les formes hépatiques (**Willcox et al ; 2004**). Des études suggèrent aussi que l'artémisinine attaque l'hémoglobine contenant un atome de Fe II (Fe^{2+}) que l'hémoglobine contenant le Fe III (Fe^{3+}) (**Willcox et al, 2004**). L'artémisinine va se lier avec l'hème et forme un complexe toxique inhibant la formation de l'hémozoïne. L'attaque du fer par l'artémisinine va provoquer un certain nombre de réarrangements à l'intérieur de la molécule d'artémisinine avec toujours un carbone central libre c'est-à-dire un carbanion. Ce dernier va attaquer les protéines parasitaires et provoque leur alkylation. En même temps, il peut attaquer les membranes parasitaires et provoquant aussi leur destruction.

- Perturbation dans le métabolisme des protéines du parasite : le mécanisme fondamental serait l'inhibition d'un enzyme, la Ca^{2+} ATPase (**Eckstein-Ludwig et al, 2003 ; Liu et al, 2006**). Cet enzyme intervient dans la synthèse des protéines cellulaires du parasite (**Eckstein-Ludwig et al, 2003**). La Ca^{2+} ATPase est présente dans le réticulum endoplasmique du parasite ; elle assure le maintien de la concentration des ions Ca^{2+} dont le rôle est fondamental pour la synthèse des protéines parasitaires (**De Ridder et al, 2008**). L'artémisinine se fixera sur la Ca^{2+} ATPase en laissant disponible le pont peroxyde ; celui-ci est rompu en présence d'ions Fe^{2+} (car le fer attire un électron de l'oxygène). Les atomes d'oxygène sont alors activés et ils attirent des H^{+} , libérant ainsi des radicaux libres de carbone. Ces radicaux libres inhibent la Ca^{2+} ATPase, ce qui entraîne la mort du parasite. L'origine des ions Fe^{2+} est imprécise : il ne semble pas s'agir du fer provenant de l'hème c'est-à-dire du produit de dégradation de l'hémoglobine consécutive à l'infestation des

globules rouges par le parasite. En effet l'artémisinine agit précocement dans le cycle parasitaire, avant la dégradation de l'hémoglobine ; par ailleurs l'artémisinine est retrouvée surtout dans les membranes cellulaires du parasite et non pas dans les vacuoles cytoplasmiques où se trouve l'hème.

- Cependant d'autres modes d'action de l'artémisinine ont été décrits à comme la perturbation de l'activité mitochondriale du parasite et le rôle d'inhibition dans l'angiogénèse.

- ✓ Perturbation de l'activité mitochondriale du parasite, le système mitochondrial est nécessaire pour la chaîne respiratoire du parasite (apport d'oxygène) et pour sa croissance. L'artémisinine serait activée par le fer contenu dans la mitochondrie. Les atomes d'oxygène du pont peroxyde ainsi activés perturberaient le transport des électrons dans la mitochondrie parasitaire provoquant une dépolarisation de la membrane mitochondriale. Ceci empêche la biosynthèse des protéines nucléiques du parasite et notamment de la pyrimidine aboutissant à la mort du parasite.
- ✓ Rôle d'inhibition de l'angiogénèse : il s'agit de la prolifération cellulaire inflammatoire réactionnelle à l'agression du parasite qui adhère à l'endothélium vasculaire, en particulier au niveau des petits vaisseaux (phénomène de séquestration). L'artémisinine aurait un effet favorable sur l'œdème et les hémorragies liées à l'inflammation vasculaire. Cet effet est particulièrement bénéfique car il atténue la sévérité du paludisme cérébral.

iv-Métabolisme de l'artémisinine

La plupart des plantes médicinales et des médicaments sont métabolisés par le foie pour inactiver leurs dérivés. La vitesse que prend le foie pour métaboliser ces substances, détermine la période de temps que ces plantes ou médicaments restent dans le corps. Si le foie est stimulé, ces plantes ou médicaments vont devenir inactives plus rapidement et leur efficacité va diminuer. Chez l'homme, l'artémisinine est transformée en une forme bioactive, le dihydroartémisinine 12 (artemorin) qui est éliminé après par glucuronidation (**Lee et Hufford, 1990; Ilett et al, 2002**). Le dihydroartémisinine 12 est un métabolite dont l'activité antiplasmodiale *ex vivo* est plus importante que l'artémisinine (**Lee et Hufford, 1990**). Le dihydroartémisinine 12 est ensuite convertie, par glucuronidation, en 12 α - et 12 β -dihydroartémisinine (**Willcox et al, 2004**). L'isomère 12 α -Dihydroartémisinine est inactive

contre les plasmodia tandis que l'isomère 12 β -Dihydroartémisinine est 20 fois plus efficace que le Dihydroartémisinine (**Ramu et Baker, 1995**). Oralement, l'artémisinine est rapidement absorbée (260 ng/ml après 1 heure) avec une biodisponibilité de 32% (**Willcox et al, 2004**). Par contre pour les formes intramusculaires et rectales nous avons respectivement des concentrations de 209 ng/ml après 3,4 heures et 170 ng/ml après 11,3 heures (**Willcox et al, 2004**).

Le métabolisme de l'artémisinine et de ses dérivés est orchestré par des cytochromes hépatiques CYP450 et CYP2B6 (**Svensson et al, 2003**). L'artésunate est convertie en DHA en quelques minutes alors que l'artéméther et arteether sont transformés plus lentement (**Li et al, 1998; Olliaro et al, 2001**). D'une part, l'élimination rapide de l'artémisinine chez l'homme est importante dans le sens où elle empêche la résistance du parasite aux formes résiduelles dans le plasma (**Cui et Su, 2009**). D'autre part, cette élimination rapide pourrait être à l'origine de recrudescence élevée (□ 25%) au cours de traitement rapide à l'artémisinine (3-5 jours). Même si un traitement à base d'artémisinine de 7 jours donne des pourcentages de guérisons de 80-90 % (**Meshnick et al, 1996; McIntosh et Olliaro, 2000; Nosten et White, 2007**), en Afrique Centrale, une monothérapie à base d'artésunate de 7 jours provoque des recrudescences de 5 et 15% après respectivement 28 et 42 jours (**Menard et al, 2005**). Bien que les dérivés d'artémisinine agissent rapidement et efficacement sur les formes plasmodiales que tous les autres antipaludiques, certains parasites ne sont pas éliminés soit ils étaient pas en phase de croissance soit ils sont endommagés et pas tués (**White 1998**).

v-Toxicité de l'artémisinine

L'artémisinine et ses dérivés sont généralement bien tolérés par l'organisme. La plupart des descriptions sur les effets secondaires de l'artémisinine sont anecdotiques (**Meshnick et al, 1996**). Chez les animaux, des doses élevées d'artémisinine sont associées à une neurotoxicité mais pas encore documentée chez l'homme (**Brewer et al, 1998 ; Nontprasert et al, 2002**).

Chez les rongeurs, l'artémisinine est à l'origine de la mort du fœtus, bien qu'aucune mutation et tétratogénicité ont été observées (**Willcox et al, 2004**). Des rapports sur l'utilisation de l'artémisinine au cours de la grossesse, n'avaient pas montré des anomalies chez des enfants dont la mère était traitée avec de l'artémisinine et ses dérivés pendant le deuxième ou troisième trimestre de la grossesse (**Wilairatana et Looareesuwan, 2002**). Dans une étude potentielle de 461 femmes enceintes (y compris 44 au premier trimestre)

traitées avec l'artésunate 13 ou l'artemether 14, aucun effet secondaire n'a été observé (**McGready et al, 2001**). Ces molécules sont recommandées pour le traitement du deuxième et troisième trimestre de grossesse au cours du paludisme sévère, mais au premier trimestre il ya une limite d'information sur leur sécurité (**Willcox et al, 2004**).

Par contre des études menées sur le rat, le lapin et le singe ont montré que l'artémisinine était à l'origine des pertes du fœtus chez ces animaux (**White et al, 2006** ; **Clark et al, 2008**). Chez l'homme des dangers d'embryotoxicité ont été observées suite à des traitements chez les femmes enceintes en début de grossesse (**Clark, 2009**). Ces résultats ne sont pas observés chez des femmes enceintes traitées avec l'artémisinine au deuxième et troisième trimestre (**Dellicour et al, 2007**). Donc il n'est pas préférable de traiter les femmes enceintes avec de l'artémisinine au premier trimestre de la grossesse.

Des tests de toxicités chez des animaux révèlent que les dérivés de l'artémisinine causent un retard, des neurotoxicités, perte de la réponse aux douleurs, perte du réflexe des yeux et des anomalies cardiaques (**Willcox et al, 2004**). Des lésions sont notées au niveau de la moelle épinière chez des animaux traités avec des doses similaires à celles utilisées chez l'homme au cours du paludisme (**Brewer et al, 1994**). Le retard noté pendant la toxicité est suggéré comme étant causé par l'accumulation du dihydroartémisinine 12. Des études ont montré que le système auditif pourrait être particulièrement sensible aux faibles doses d'artémisinine et que, au moins chez le rat, un dysfonctionnement auditif pourrait être, très tôt un signe de neurotoxicité. Bien qu'il a un rapport chez un patient à parole mal articulé suite au traitement avec un dérivé de l'artémisinine, artésunate, (**Miller et Panosian, 1997**), il ya aucune preuve justifiant cette relation.

Le mécanisme de la neurotoxicité peut être expliqué ainsi : l'artémisinine et ses analogues sont cytotoxiques pour les neurones et les cellules gliales en culture (**Fishwick et al, 1995**). Le cerveau contient une quantité importante de fer, le mécanisme de la neurotoxicité peut être similaire au mécanisme d'action de l'artémisinine. Ainsi, il a été démontré que la toxicité des dérivés de l'artémisinine aux cellules neuroniques est augmentée par la présence de l'hème (Fer III) (**Smith et al, 1997**) et comme l'hémozoïne est présente dans le cerveau des patients atteints de neuropaludisme, ceci peut expliquer le rapport de ce mécanisme avec celui de l'artémisinine et ses analogues. Quand les cellules neuroblastulaires des souris sont incubées avec de l'artémisinine, plusieurs protéines neuronales sont alkylées mais moins efficacement que les protéines plasmodiales incubées dans les mêmes conditions (**Kamchonwongpaisan et al, 1997**). Des études supplémentaires de **Fishwick et al., 1998a**

fournissent des informations supplémentaires sur l'alkylations des protéines par contre une autre étude (**Fishwick et al ; 1998b**) suggère que la mitochondrie et d'autres organelles membranaires peuvent être perturbées par l'artémisinine et ses dérivés. Les effets de l'artémisinine sur les cellules neuronales en cultures sont comparés avec ceux des cellules neuronales corticales et des astrocytes en culture (**Schmuck et al, 2002**).

II-7-2 Les composés phénoliques : les flavonoïdes

La phytothérapie, étymologiquement le traitement par les plantes, est une méthode thérapeutique qui utilise l'action des plantes médicinales. On peut distinguer deux types de phytothérapie :

- Une pratique traditionnelle, parfois très ancienne basée sur l'utilisation de plantes selon les vertus découvertes empiriquement. Selon l'OMS, cette phytothérapie est considérée comme une médecine traditionnelle et encore massivement employée dans certains pays dont les pays en voie de développement. C'est une médecine parallèle du fait de l'absence d'étude clinique
- Une pratique basée sur les avancées scientifiques et la recherche des principes actifs des plantes. Cette phytothérapie est assimilée aux médicaments et selon les pays suit les mêmes réglementations. On parle alors de pharmacognosie.

L'interaction entre les propriétés pharmacocinétiques d'une part et pharmacodynamiques d'autre part déterminent le niveau d'activité du médicament mais aussi des produits actifs contenus dans les plantes médicinales.

Les polyphénols sont des composés aromatiques qui regroupent un certain nombre de substances fréquentes dans les drogues végétales, de composition et d'action souvent variables. Ils peuvent accompagner chez la plante d'autres substances actives. C'est dans ce groupe que l'on retrouve les flavonoïdes. Avant lui E. Chevreu isola en 1814, la première substance flavonoïde obtenue à l'état pur, le « morin » (**Bohm et al, 1998**). C'est la couche externe des écorces d'oranges, le flavedo, qui a prêté son nom aux micronutriments protecteurs que sont les flavonoïdes. Ce terme rassemble une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Les flavonoïdes sont largement distribués dans le règne végétal où ils sont présents le plus souvent sous la forme soluble d'hétérosides. Ils sont fréquents chez les Bryophytes (mousses et hépatiques), les Ptéridophytes (fougères) et les Gymnospermes (conifères) mais c'est chez les angiospermes qu'ils manifestent la plus grande diversité. Les flavonoïdes sont des pigments responsables de la coloration des fleurs et

des fruits. Ils couvrent une large gamme de couleur allant du rouge à l'ultraviolet en passant par le jaune. Leur couleur dépend de leur structure mais aussi de l'acidité du milieu (pH).

Les flavonoïdes possèdent un squelette de base à quinze atomes de carbone, constitué de deux noyaux aromatiques et d'un noyau central pyranique, pourvus d'au moins une fonction hydroxyle. Selon, entre autres, le degré d'oxydation du noyau pyranique, on classe les flavonoïdes sur base du nombre, de la position et de la nature des substituants (groupements hydroxyles -OH et méthoxyles OCH₃ principalement), sur la base des deux cycles aromatiques A et B et sur celle de la chaîne de carbone intermédiaire (**Bourzeix et al, 1986**).

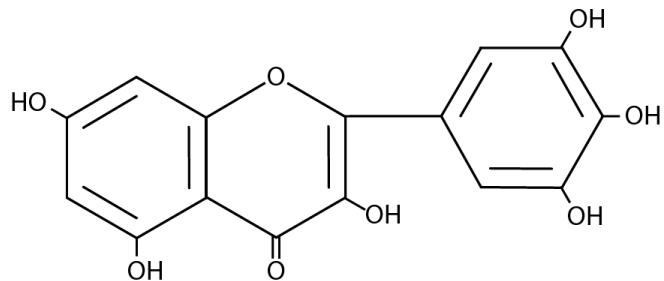


Figure 11 : Structure chimique d'une molécule de flavonoïde

Ils ont donc en commun une même structure, dont les multiples substitutions permettent de les diviser en plusieurs classes. Cependant la répartition des différentes molécules ne semblent pas faire l'unanimité de la littérature. Ainsi il existe plusieurs classements proposés parmi lesquels on divise les flavonoides en plusieurs classes que sont : les flavones, les flavonols, les Dihydroflavonols ou flavanonols, les flavanones, les aurones, les chalcones, les dihydrochalcones.

Les flavonoïdes sont couramment consommés quotidiennement sous forme de fruits, légumes et de boisson. Ils sont capables de moduler l'activité de certaines enzymes et de modifier le comportement de plusieurs systèmes cellulaires, suggérant qu'ils pourraient exercer une multitude activités biologiques, notamment des propriétés anti oxydantes, vasculoprotectrices, anti hépatotoxiques, antiallergiques, anti-inflammatoires, antiulcéreuses et même anti tumorales significatives. Il a été aussi démontré que les flavonoïdes sont de puissants antioxydants offrant tout une batterie de fonctions biochimiques particulièrement intéressantes pour notre santé. Ils jouent un rôle important dans la fonction immunitaire, l'expression génique, la circulation sanguine dans les capillaires et le cerveau, l'activité

enzymatique, l'agrégation des plaquettes et le métabolisme du collagène, des phospholipides, du cholestérol et de l'histamine. Les flavonoïdes ont la capacité de piéger les radicaux libres (hydroxy, anion superoxyde et des radicaux peroxy lipidique) générés par notre organisme en réponse aux différentes agressions de notre environnement (cigarette, polluants, infections, etc.) et qui favorisent le vieillissement cellulaire. Les flavonoïdes ont la capacité de diminuer la perméabilité des capillaires sanguins et de renforcer leur résistance. Les flavonoïdes améliorent la microcirculation sanguine au niveau des mains et des pieds. On leur reconnaît aussi des effets protecteurs contre les maladies hormono-dépendantes. En effet, les isoflavones interagissent de manière spécifique avec les récepteurs des oestrogènes et inhibent les bouffées de chaleur chez la femme ménopausée. Pour cela, ils sont maintenant considérés comme phyto-oestrogènes. La quercétine de l'oignon et le kaempferol de la chicorée, possèdent également des propriétés pseudo-oestrogéniques qui inhibent la perte osseuse chez la rate ovariectomisée. Les flavonoïdes ont pour effet aussi d'inhiber l'activité d'une enzyme, la topoisomérase II, qui joue un rôle essentiel dans l'apparition du cancer, notamment la maladie de Hodgkin. Les flavonoïdes, ont largement montré leurs effets protecteurs contre plusieurs cancers, dont la prostate, le côlon et le poumon. Les flavonoïdes peuvent aussi prévenir la douleur musculaire, en accélérant la réparation des tissus au niveau moléculaire. Spécifiquement, ils éliminent la synthèse de l'oxyde nitrique, déclencheur chimique de l'inflammation. Il a été également démontré que d'autres flavonoïdes inhibaient la sécrétion des mastocytes impliqués dans les phénomènes inflammatoires.

C'est également de même processus de synthèse de l'oxyde nitrique qui renverserait la dysfonction endothéiale responsable des pathologies diabétiques. Des polyphénols issus du thé et de la cannelle potentialiseraient l'action de l'insuline dans les cellules.

L'*A. annua* contient plus de 36 flavonoïdes (**Bhakuni et al, 2002 ; Tang et Eisenbrand, 1992**). Certains d'entre eux suppriment les enzymes CYP450 qui inhibent l'absorption intestinale de l'artémisinine (**Ferreira et al, 2010**). Et si on enlève les flavonoïdes de la tisane (par séchage à température élevée) et encore si on administre l'artémisinine sous forme de pilule en monothérapie, elle a non seulement la difficulté à passer la paroi intestinale mais aussi est détruite par les cytochromes dans le plasma. Certains flavonoïdes inhibent le développement intraérythrocytaire de *P. falciparum*. La culture de *P. falciparum* est stoppée par le 1,8 cinéole (**Vsu et al, 2008**).

II-7-3 Les éléments minéraux

Les plantes médicinales fournissent près de 80% des médicaments mondiaux (**Koche, 2011**). Le siècle passé était marqué par une ascension fulgurante de l'utilisation des plantes médicinales due à l'absence d'effets secondaires, leur disponibilité et leur accessibilité pour toutes les franges de la population. La valeur médicale des plantes est due d'une part par la présence des éléments minéraux (**Koche, 2011**). Donc il est essentiel de connaître les phytoconstituants, les éléments et les vitamines contenus dans la plante afin de pouvoir évaluer l'importance thérapeutique des plantes. L'environnement, la pollution, l'atmosphère et le sol sont autant de facteurs qui peuvent provoquer la contamination des plantes par les métaux et les éléments microbiologiques. Les éléments minéraux ont des rôles curatifs et préventifs. Il est donc très important de déterminer le pourcentage de ces éléments dans la plante, car à des doses élevées ils peuvent être dangereux et toxiques pour l'organisme (**Schumacher et al, 1991**). Différents éléments peuvent être répertoriés dans la plante à savoir : les macroéléments, les micros éléments ou éléments en trace et les éléments non essentiels ou toxiques. Les macroéléments ou macro minéraux sont ceux dont la concentration quotidienne est supérieure à 100 mg dans le corps (**Imelouane et al, 2011**). C'est le cas du phosphore, calcium, magnésium, sulfure, potassium, chlore et sodium. Par contre les micros minéraux ou minéraux en trace sont ceux dont la concentration quotidienne est inférieure à 100 mg. C'est le cas du zinc, fer, silicium, manganèse, cuivre, fluor, iodé et chrome.

La détermination analytique des métaux contenus dans les plantes médicinales est très importante pour le contrôle qualité car elle détermine la sécurité, l'efficacité et la pureté de la tisane comme le recommande l'Organisation Mondiale de la Santé (**OMS, 1992**). Il a été établi que le fait d'accumuler des doses élevées d'éléments minéraux, contenus dans la tisane, peut mener à des problèmes sanitaires chez l'homme (**Sharma et al, 2009**). Ceci démontre encore de plus que les éléments contenus dans les tisanes doivent faire l'objet de contrôle de qualité (**Schroeder, 1965 ; Somer, 1983 ; Liang et al, 2004 ; Arceusz, 2010**). Plusieurs auteurs, à travers des études, ont démontré l'importance des éléments minéraux contenus dans les plantes médicinales tout en mettant l'accent sur les éléments en trace ou microéléments (**Kalias et Loukis, 1987 ; Wong et al, 1993 ; Ajasa et al, 2004 ; Basgel et Erdemoglou, 2005 ; Shedad et al, 2006 ; Koe et Sari, 2009 ; Sharma et al, 2009**). La plupart de ces études concluent que les métaux essentiels peuvent être toxiques quand ils sont consommés à des concentrations élevées tandis que les métaux non essentiels sont toxiques même à faible dose (**Jabeen et al, 2010**). La commission Européenne a même établi des limites concernant

la présence des métaux comme le plomb (Pb), le cadmium (Ca) et le mercure (Hg) dans les aliments depuis mars 2001 (**Commission Regulation, 2001**).

Les microéléments ont des fonctions très importantes car ils sont supposés être la clé de certaines protéines comme l'hémoglobine et certaines enzymes même à faible dose. **Basgel et Erdemoglu** reportent des doses quotidiennes de minéraux chez une personne de 70 kg après des prises quotidiennes de tisane : 500 mg de Ca, 300 mg de Mg, 15 mg de Fe, 5 mg de Al, 2,8 mg de Mn, 15 mg de Zn, 2,5 mg de Cu, 1,6 mg de Sr, 1,1 mg de Ba, 0,025 mg de Ni, 0,05-0,2 mg de Cr, 0,04 mg de Co, 0,415 mg de Pb et 0,057 mg de Cd (**Basgel et Erdemoglou, 2005**). Des doses optimales d'éléments minéraux comme le sodium, potassium, le magnésium, calcium, manganèse, calcium, cuivre, zinc et iode peuvent réduire des risques comme les accidents cardiovasculaires chez l'homme et les animaux (**Anke et al, 1984 ; Sanchez-Castillo, 1998**).

Le calcium (Ca) est le principal composant des os et des dents. Il régule les enzymes et la pression artérielle au niveau des cellules membranaires et des muscles (**Kılıç and Köse, 2001**).

Le sodium (Na) et potassium (K) sont d'une importance capitale car ils interviennent dans la régulation de plusieurs systèmes de l'organisme. Le sodium est excrété par la sueur à l'extérieur de l'organisme mais aussi les diarrhées et les vomissements causent des pertes considérables de sodium et de potassium. Le thé, le café et les fruits sont des sources importantes de sodium et de potassium. Les doses quotidiennes de sodium et de potassium sont respectivement 2,4 g et 3,5 g (**Baysal, 2002**). Le potassium est important pour tous les organismes vivants à l'exception des algues bleues et vertes (**Sharat Singh et al, 2010**). C'est un cation très important pour l'activité nerveuse (**Sharat Singh et al, 2010**). Il est présent dans les liquides intracellulaires comme ceux extracellulaires. Dans la cellule, avec le sodium, ils assurent l'équilibre acido-basique, la régulation de la pression osmotique et la rétention de l'eau (**Sharat Singh et al, 2010**). A l'extérieur des fluides le potassium peut influencer l'activité musculaire.

Le zinc (Zn) est un micro élément essentiel pour tous les organismes et joue un rôle important dans le métabolisme, la croissance et le développement (**Sharat Singh et al, 2010**). C'est un composant essentiel pour plus de 200 enzymes qui ont des rôles catalytiques et structuraux (**Sharat Singh et al, 2010**). Un déficit en zinc se caractérise par des infections récurrentes, absence d'immunité et malformation (**Singh, and Garg, 1997**). Une faible dose de zinc peut causer une maladie de l'artère coronaire (**Singh et al, 1997**). Les études

cliniques ont prouvé que le zinc peut avoir des effets bénéfiques en éliminant les ulcères et en promouvant la guérison des blessures (**Chen et al, 1993 ; Agram, 1990**). Une supplémentation en zinc est bénéfique car elle favorise la croissance, améliore l'immunité et diminue la morbidité et la mortalité (**Singh et al, 1997 ; Singh, and Garg, 1997 ; Mukherejee et al, 2008**).

Le fer (Fe) aussi est très important pour l'organisme dans la production de l'hémoglobine et dans l'oxygénation des globules rouges sanguins (**Sharat Singh et al, 2010**). Il joue un rôle capital dans le fonctionnement du système immunitaire et dans la production d'énergie (**Sharat Singh et al, 2010**). Plusieurs déficits en fer peuvent subvenir suite à des anémies mais aussi d'une faible quantité d'hémoglobine au niveau des globules rouges. Une supplémentation en fer peut prévenir les anémies et peut réduire des problèmes cognitifs liés à l'anémie (**Beard, 2001 ; Grantham-McGregor and Ani, 2001**).

Cependant les déficits en fer et en zinc sont fréquents chez les enfants dans les pays en développement et augmentent la morbidité et la mortalité infantile (**Black, 2003**). Le fer et le zinc sont compétitifs pour l'absorption ou bien interagissent, cependant l'apport de chacun est amoindri s'ils sont pris isolément (**Whittaker, 1998 ; Walker et al, 2005**)

Le cobalt (Cb) est un composant important de la vitamine B12 qui a une multitude de fonctions pour l'homme. Il est responsable de la régénération de l'acide folique (**Djama et al, 2011**). L'acide folique est nécessaire au métabolisme de la graisse, des protéines et des acides nucléiques (**Djama et al, 2011**). Un déficit en vitamine B12 provoque une fatigue générale, une perte d'appétit et une anémie (**Djama et al, 2011**).

Le cuivre(Cu) est activement nécessaire dans la synthèse de l'hémoglobine et peut jouer un rôle vital dans le contrôle de l'anémie (**Harris, 1997 ; Tumlund, 1999**).

Le nickel (Ni) est un cofacteur qui facilite l'absorption du fer (**Nielsen, 1985**) et évite les anémies (**OMS, 2001**). L'absorption du nickel par le corps est très faible (**Onianwa et al, 2000**).

Le manganèse est largement répandu dans le corps comme un activateur d'enzyme. Chez l'homme, des déficits en manganèse peuvent provoquer des dommages au niveau de la peau, des anémies et des hypercholestérioses (**Shenkin, 1998**). Il élimine la fatigue et réduit l'irritabilité nerveuse (**Djama et al, 2011**). Le manganèse joue le rôle de catalyseur dans les réactions d'oxydation (**Sharat Singh et al, 2010**). Il est essentiel pour tous les organismes et active de nombreux enzymes (**Sharat Singh et al, 2010**).

Le cadmium (Cd) et le plomb (Pb) sont trop toxiques et peuvent provoquer des empoisonnements chroniques et des effets secondaires au niveau des reins, du foie et du système immunitaire (**Heyes, 1997**).

Le chrome fonctionne comme un facteur de tolérance du glucose (**Sharat Singh et al, 2010**). Il est aussi utiliser comme un signal de l'insuline et joue un rôle très important dans le métabolisme du sucre et aussi du diabète (**Chen et al, 1993**).

II-7-4 Les protéines végétales

Le niveau de consommation en viande des pays est aujourd’hui régulièrement dénoncé aussi bien pour des questions environnementales (consommation d'eau, mobilisation de terres agricoles, diffusion de gaz à effet de serre ...) que de santé (maladies cardiovasculaires, hypercholestérolémie, cancers digestifs).

Choisir de réduire, voire d'arrêter, sa consommation en viande, nous conduit rapidement à rechercher un nouvel équilibre alimentaire auquel des habitudes culinaires largement carnées ne nous ont pas préparés. Se pose ainsi notamment la question de l'apport en protéine dont notre corps a besoin. Pour y répondre, des alternatives végétales existent, accessibles à tous, elles comportent de nombreux avantages aussi bien pour notre santé que pour l'environnement. Mais aussi pour notre budget. Ainsi, d'un point de vue nutritionnel, les protéines végétales sont une excellente source de vitamines, de minéraux, de bons glucides, de fibres alimentaires et d'antioxydants.

Composant essentiel de l'alimentation, les protéines sont formées de chaînes d'acides aminées, indispensables au bon fonctionnement de notre organisme. En plus de subvenir le corps en azote et en carbone pour le métabolisme, les protéines maintiennent le système immunitaire, digestif, sexuel et permettent la croissance et la réparation des tissus. Parmi les 22 acides aminés existants, 8 sont considérés comme essentiels pour l'homme, le corps ne pouvant pas les synthétiser. Ces acides aminés doivent donc être apportés par l'alimentation via les protéines animales ou végétales. Les recommandations nutritionnelles actuelles recommandent un apport de 0,8 grammes de protéines par kilo de poids idéal. Pour un individu de 60 kg, le besoin est donc environ de 50 g par jour.

Les protéines végétales, présentes dans l'*A. annua* peuvent à elles seules répondre aux besoins nutritionnels si une alimentation végétale variée est consommée et que les besoins en énergie sont satisfaits. Les recherches indiquent qu'un assortiment d'aliments végétaux mangés au cours d'une journée peut apporter tous les acides aminés essentiels et assurer une

absorption et une utilisation appropriées de l'azote chez des adultes en bonne santé ; par conséquent, il n'est nullement besoin de consommer des protéines complémentaires dans un même repas (**Association des diététiciens des Etats Unis et du Canada, 2003**).

II-8 Pharmacocinétique et pharmacodynamique de la tisane d'*A.annua*

La pharmacocinétique, parfois désignée sous le nom de phase ADME (Absorption, Distribution, Métabolisme et Excrétion du principe actif et de ses métabolites), et qui suit la phase biopharmaceutique, a pour but d'étudier le devenir d'une substance contenue dans un médicament dans l'organisme. La pharmacocinétique est comme la pharmacodynamie une sous-discipline de la pharmacologie. Un aphorisme le définit comme « ce que fait l'organisme à un médicament », tandis que la pharmacodynamique est définie « comme ce que le médicament fait à l'organisme ». C'est-à-dire la pharmacocinétique peut être définie comme l'évolution dans le temps des concentrations de médicaments dans le sang tandis que la pharmacodynamique peut être définie comme l'action du médicament (intensité et durée de son action) sur l'organisme. Une fois dans le sang, plusieurs médicaments doivent être métabolisés par le foie soit pour devenir actif en tant que traitement soit pour être évacués du sang. Ainsi le foie joue un rôle important dans la régulation des taux sanguins des médicaments et influe beaucoup sur l'efficacité de ces derniers. Les plantes médicinales peuvent modifier la façon dont les médicaments sont métabolisés par le foie. La concentration plasmatique de l'artémisinine contenue dans la tisane d'*A. annua*, après absorption, a été démontrée dans plusieurs études. Rath, en 2004 avait étudié la concentration plasmatique de l'artémisinine après ingestion de 1 litre de tisane d'*A. annua* contenant 94,5 mg d'artémisinine (**Räth et al, 2004**). Il avait déterminé les concentrations plasmatiques d'artémisinine 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, et 8 heures après ingestion de la tisane. La concentration d'artémisinine plasmatique maximum, 30 minutes après ingestion de la tisane, est égale à 240 ng/ml (**Räth et al, 2004**). Cette valeur peut être comparée avec 8 autres obtenues après ingestion de 500 mg d'artémisinine pure (**Duc et al, 1994 ; Alin et al, 1996 ; Gordi et al, 2000**) avec une concentration plasmatique maximum de 531 ng/ml. Cette concentration, contrairement à celle de l'artémisinine contenue dans la tisane, est obtenue 2,3 heures après ingestion. Elle est de 615 µg/l dans l'étude de Alin (**Alin et al, 1996**) ; 391µg/l dans l'étude faite par Duc (**Duc et al, 1994**) et de 364 µg/l dans le travail de De Vries (**Vries (de), 1997**). La concentration plasmatique élevée après absorption d'une tisane de 9g de feuilles suggère que l'artémisinine naturelle présente dans la tisane est mieux absorbée que

l'artémisinine en comprimés. La dose d'artémisinine contenue dans la tisane est de loin inférieure à celle obtenue à partir des comprimés. Comment se fait-il qu'on se retrouve à peu près avec la même concentration plasmatique ? Plusieurs mécanismes peuvent être discutés pour tenter de donner des explications :

- Efficacité de l'artémisinine à faible dose : **Ashton et al. (1998)** avait suggéré que les doses quotidiennes de 500 mg d'artémisinine étaient élevées. Les doses rectales de 500 mg sont également efficaces car leur biodisponibilité est de 30% (équivalent à une dose orale de 160 mg). Il ya une très grande variabilité pour les concentrations plasmatiques d'artémisinine après une prise orale et rectale. **Rath et al. (2004)** ont trouvé qu'après ingestion de 1 litre de tisane d'*A. annua* contenant 94,5 mg of artémisinine, la concentration plasmatique d'artémisinine reste efficace pendant plus de 4 heures (**Willcox et al, 2004**).
- Amélioration de la biodisponibilité de l'artémisinine : l'artémisinine pure prise oralement a une faible biodisponibilité, environ 32% (**Titulaer et al, 1990**). L'artémisinine est faiblement soluble dans l'eau et dans les huiles, cependant on note une bonne solubilité dans les solvants organiques. Les infusions d'*A. annua* contiennent plus d'artémisinine qu'une infusion d'artémisinine pure (**Willcox et al, 2004**). Ceci peut être dû par la présence d'autres constituants contenus dans la tisane. Par exemple, les flavonoïdes augmentent la dissolution et l'action de l'artémisinine (**Mueller et al, 2000**). La saponine utilisée dans la médecine traditionnelle augmente aussi la solubilité de l'artémisinine. L'absorption de l'artémisinine est aussi plus importante dans la tisane qu'au niveau des capsules, avec un pic maximale de concentration plasmatique en 30 minutes (2, 3 heures après ingestion des capsules) (**Willcox et al, 2004**).
- Inhibition du catabolisme de l'artémisinine : la biodisponibilité de l'artémisinine est réduite par un facteur 6,9 par le cinquième jour de traitement (**Sidhu et al, 1998**). La cause pourrait être due par l'auto-induction des enzymes hépatiques (**Svensson et al, 1998**), bien que la demi-vie de l'artémisinine reste inchangée. La concentration plasmatique du dihydroartémisinine augmente avec le traitement correspondant à une diminution de la concentration de l'artémisinine (**Van Agtmael et al, 1999**). *In vitro*, les enzymes qui médiatisent le catabolisme de l'artémisinine sont les cytochromes P450 et 2B6 (**Svensson and Ashton, 1999**).

- Immunostimulation : l'artémisinine stimule la phagocytose des macrophages chez la souris (**Ye et al, 1982**). En outre, après traitement avec l'artémisinine, les macrophages de la souris phagocytent plus les érythrocytes infectés par *P. berghei*. L'activité de l'acide phosphatase des macrophages est aussi améliorée par la tisane. Cette propriété de l'artémisinine peut stimuler la réponse immune contre la malaria.
- Présence d'autres constituants avec une activité antimalarique : Des espèces d'artémisia autres qu'*A. annua* ont des activités antimalariques sans pourtant avoir de l'artémisinine (**Valecha et al, 1994**). *A. absinthium* et *A. abrotanum* sont utilisés dans le traitement de la malaria en Europe mais cette activité est attribuée à d'autres constituants autres que l'artémisinine (**Cubukcu et al, 1990 ; Deans et Kennedy, 2002**). Les extraits d'*A. afra* sont efficaces contre *P. falciparum* *in vitro* et cette activité est attribuée au complexe flavonoïdes-sesquiterpènes (**Kraft et al, 2003**). L'*A. annua* comprend différents composés, au moins 28 monoterpènes, 30 sesquiterpènes, 12 triterpénoides et stéroïdes, 36 flavonoides, 7 coumarines, 4 composés aromatiques et 9 composés aliphatiques (**Bhakuni et al, 2002 ; Tang et Eisenbrand, 1992**). Ceci montre que l'artémisinine n'est pas le seul constituant présent dans la tisane (**François et al, 1993**).
- Synergie des autres constituants de l'*A. annua* : L'artémisinine est un des 30 sesquiterpènes présents dans l'*A. annua*. Certains sesquiterpènes sont à des concentrations plus élevées que l'artémisinine dans la plante, par exemple arteannuin B est 2 à 4 fois plus élevé que l'artémisinine et acide artémisinique 7 à 8 fois plus élevés (**Willcox et al 2004**). Tous ces deux sesquiterpènes ont des propriétés antibactériales et antifongiques (**Dhingra et al, 2000**). Arteannuin B, utilisé seul est toxique chez le rat atteint de paludisme, mais associé avec l'artémisinine il augmente son effet (**Chang et But, 1986**). *A. annua* produit au moins 36 flavonoïdes. La plupart d'entre eux ont des propriétés antipaludiques *in vitro* bien qu'ayant des IC_{50} inférieures à celle de l'artémisinine. Cinq d'entre eux, artémétine, casticine, chrysoplénétine, chrysosplénol-D et cirsilinéole augmentent l'activité *in vitro* de l'artémisinine contre *P. falciparum* (**Liu et al, 1992**). Chrysosplénol-D potentialise l'effet de l'artémisinine et est le plus abondant flavonoïde dans la plante (**Liu et al, 1992**). Bien que n'ayant pas d'effet direct sur l'hème, les flavonoides peuvent catalyser la réaction de l'artémisinine avec l'hème (**Bilia et al, 2002**).

CHAPITRE II: *Matériels et Méthodes*

I- Cadres de l'étude

I-1 Le poste de santé Touba Diacksao

Le poste de Santé de Touba Diacksao est situé dans le département de Pikine (figure 12). Le plateau médical est constitué d'un chef de poste (infirmier), des infirmiers, des aides infirmiers, des sages-femmes, des aides sages-femmes et des aides soignants. Les structures notées sont : une pédiatrie, une maternité, des salles d'hospitalisation et de consultation.

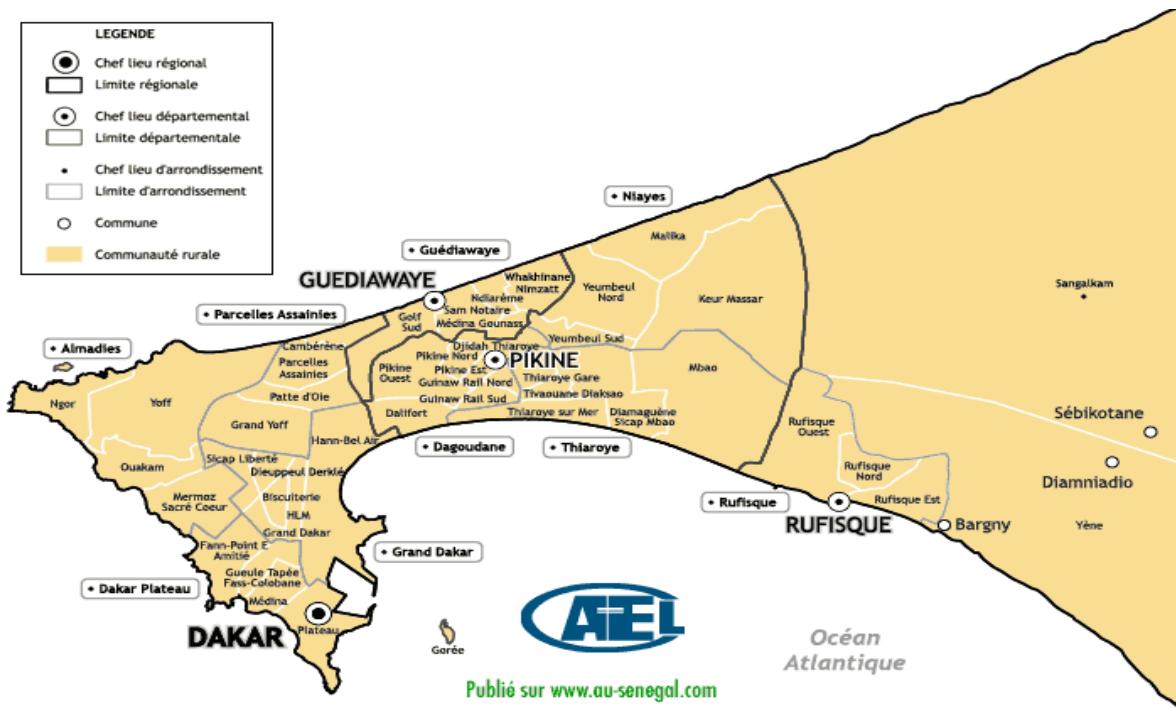


Figure 12: Découpage administratif de la région de Dakar

Source : www.ou-senegal.com

I-1-1 Caractères géo climatique

Pikine est située dans la presqu'île du Cap Vert. C'est une ville considérée comme satellite de celle de Dakar. Elle est située à 14°30 de latitude Nord et 17°20 de longitude Ouest. C'est une agglomération proche des Niayes. Ville sahélienne, elle connaît une longue période de saison sèche, allant approximativement du mois d'octobre au mois de juillet, puis une saison pluvieuse, avec des précipitations de l'ordre de 400 mm par an. Les

amplitudes thermiques annuelles y sont importantes : minima nocturnes de 10 à 31°C, maxima diurnes de 14 à 39°C. L'humidité relative reste peu élevée.

I-1-2 Population de Pikine

L'agglomération de Pikine est en pleine expansion et abriterait plus d'un million d'habitants. On y note toutes les ethnies du pays : Wolof (55%), Toucouleurs (11%), Maures (8,5%), Sérères (7%) et divers (18,5%) (**Seck, 1968**). Elle constitue une population très variable surtout avec l'exode des habitants de l'intérieur du pays, qui concerne plus particulièrement les adultes jeunes de sexe masculin. Les cultures maraîchères occupent une place prépondérante dans l'activité de ces populations en raison de la proximité des Niayes et de la présence de collections d'eaux permanentes dans certains quartiers (**Salem et Le Gros, 1994**).

I-1-3 Endémisme paludéen à Pikine

La transmission du paludisme débute en août et se prolonge jusqu'en décembre, surtout du fait de l'existence des collections d'eaux permanentes. Le niveau de transmission reste cependant très faible, au maximum une piqûre infestante par personne et par an, en bordure de marais (**Trape, 1986; Salem et Le Gros, 1994**). La population vectorielle est formée d'anophèles du complexe *An. gambiae s.l* et surtout de l'espèce *An. arabiensis* qui y sévit toute l'année (**Diallo et al., 2000**).

Les culicidés sont aussi rencontrées, comme dans d'autres centres urbains avec une large prédominance de *Culex quinquefasciatus* (**Salem et Le Gros, 1994**).

La zone de Pikine est considérée comme hypo endémique car l'IP est de 2 à 7% selon les saisons et les quartiers de la ville (**Trape et al., 1989**). Le paludisme y est responsable de 12,4% de l'ensemble de la pathologie fébrile (**Gaye et al., 1991**).

I-2 Le service de lutte antiparasitaire de Thiès

Le Service de Lutte Anti-Paludique (SLAP) est créé en 1953. Il est logé au centre ville de la commune de Thiès (figure 13). Les missions du SLAP sont, la mise au point et l'application des mesures de lutte les plus appropriées pour parvenir à l'arrêt de la transmission des maladies parasitaires notamment le paludisme, les bilharzioses, l'onchocercose, la filariose lymphatique, la trypanosomiase humaine africaine.

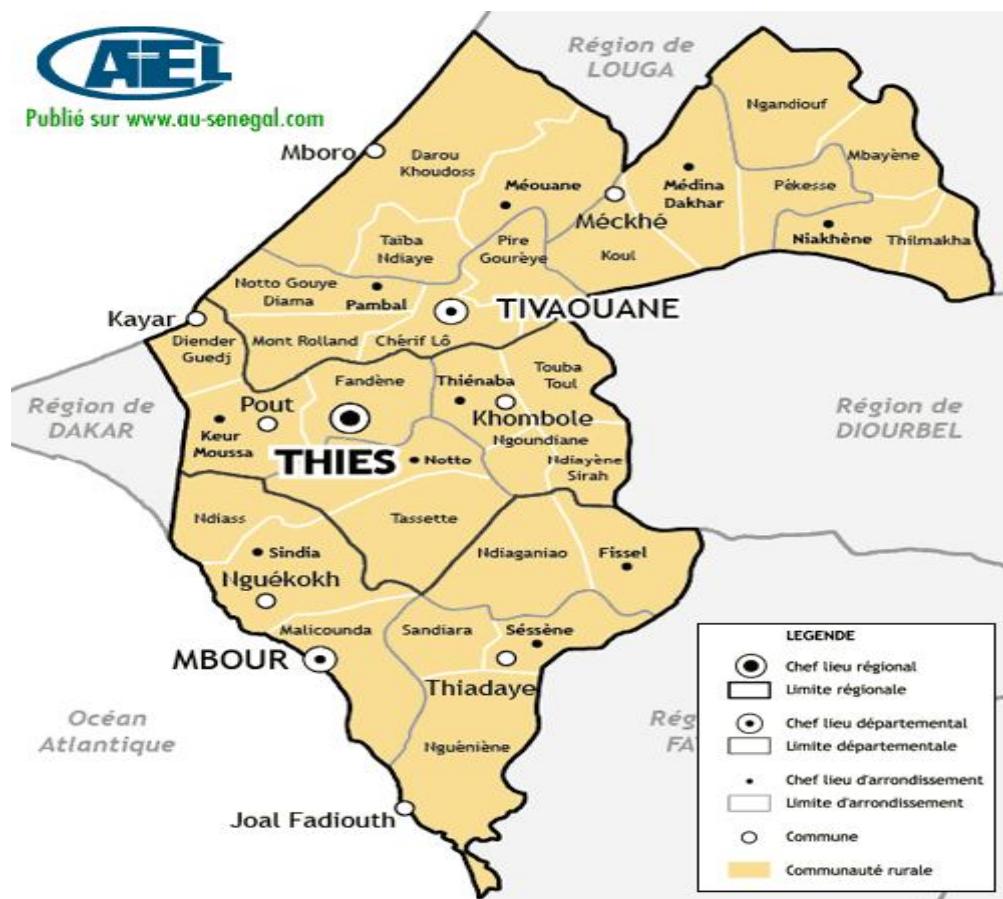


Figure 13 : Carte de la région de Thiès

Source : www.ou-senegal.com

I-2-1 Caractères géo climatiques

D'une superficie de 6601km², soit 3,35% du territoire national, la région de Thiès fait partie avec Dakar et Diourbel, des plus petites régions du pays. Elle est située au centre de la zone soudano-sahélienne et est limitée par les régions de Louga au nord, de Fatick au sud, de

Diourbel à l'Est, de Dakar et de l'océan atlantique à l'ouest. La région de Thiès comprend trois départements, à savoir Mbour, Thiès et Tivaouane et est constituée d'un relief relativement plat. Les espèces végétales les plus rencontrées sont le baobab, le ronier, le Kadd. La faune recèle diverses espèces (lièvres, perdrix, chats sauvages).

C'est une région qui possède d'importantes nappes souterraines et superficielles, l'eau est généralement de bonne qualité (salinité inférieure à 0,3g/l) et la moyenne pluviométrique est de 300 à 500 mm³ par an. La région de Thiès peut être divisée en quatre zones.

- La grande côte ou zone côtière des Niayes répartie entre les régions de Dakar, Thiès, Louga, Saint Louis.
- La petite côte est une zone essentiellement constituée de sable fin et connaît un ensoleillement permanent.
- Le bassin arachidier
- La zone du massif de Ndiass à cheval entre Thiès et Dakar.

I-2-2 Population de Thiès

La région de Thiès est en pleine expansion et abrite 1.525.377 habitants soit 12,88% de la population nationale (2ème après Dakar). On y trouve toutes les ethnies du pays avec une population rurale à 75% constituée en majorité de wolof musulmane. La pêche, les industries et mines, le tourisme, le transport, l'élevage, l'agriculture, les télécommunications occupent une place importante dans la vie économique de cette région.

I-2-3 Endémisme paludéen de Thiès

Le paludisme y est hypo endémique avec une recrudescence pendant la saison des pluies. Des formes graves y sont diagnostiquées à tout âge mais surtout chez les jeunes. La prévalence du paludisme dans la population générale se situe à 26%, avec une morbidité et une létalité respectivement de 39,9 et 2,5%.

La transmission du paludisme dans la région est l'œuvre d'*An. arabiensis* avec un taux d'inoculation entomologique inférieur à 5 et dont les gîtes larvaires sont constitués par les céanes, puits peu profonds et par les plaques d'inondations.

I-3 Les laboratoires d'étude

La manipulation et les différentes techniques de cette thèse ont été faites dans différents laboratoires:

- Le laboratoire de Bactériologie-Virologie de l'hôpital Aristide Le Dantec. Ce laboratoire comporte quatre unités qui sont sous la direction du Pr Souleymane MBOUP. Les quatre unités sont : l'unité de Bactériologie, l'unité de Virologie, l'unité d'immunologie et l'unité de Biologie moléculaire. Cette dernière abrite deux sections, VIH et Malaria. C'est dans la section Malaria où se trouve le laboratoire qui nous a permis de faire nos manipulations sur le DAPI-test.
- Le laboratoire de Parasitologie et Mycologie de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar. Ce laboratoire comporte deux parties, une à l'université sous la direction du Professeur Omar NDIR et une ramification à l'hôpital Aristide Le Dantec sous la direction du Professeur Daouda NDIAYE (directeur de Thèse). Une partie des manipulations de la thèse sur la chimiosensibilité (DELI-test et DAPI-test) a été faite dans ces deux structures sous la direction du Professeur Daouda NDIAYE.
- Le laboratoire de l'Institut de Technologie Nucléaire Appliquée à l'Université Cheikh Anta DIOP. Ce laboratoire, sous la direction du Professeur WAGUE, nous a permis d'effectuer les analyses avec la technique du LIBS. Dans ce laboratoire, il ya des matériels de physique très sophistiqués, des étudiants en thèse mais aussi en Master. Nous avons réalisé notre étude sous la tutelle du Docteur Mouhamadou DIALLO.

II- Matériels d'étude

II-1 Matériel Biologique

Dans le cadre de notre étude sur la chimiosensibilité *ex vivo* des souches plasmodiales, nous avons procédé à un recrutement de paludéens à Pikine (poste de santé de Touba Diacksao) et à Thiès (Service de Lutte Antipaludique). Les cas d'accès palustre sont diagnostiqués au microscope après la confection d'un frottis sanguin et/ou d'une goutte épaisse qui est coloré au GIEMSA. Seuls les cas de paludisme simple à *P. falciparum* sont inclus dans l'étude. Avant d'être recruté, les membres de l'équipe de recherche expliquent au malade les raisons pour lesquelles on souhaiterait le recruter. Le consentement éclairé de chaque patient est nécessaire. Les parents de mineurs sont sollicités pour permettre le

recrutement de leurs enfants. Pour chaque patient, un prélèvement sanguin est fait au pli du coude par des techniciens. Le sang (5 millilitres) est recueilli dans des tubes EDTA et sur du papier filtre, Whatman®. L'étude a été approuvée par le comité d'Ethique du Ministère de la Santé et de la Prévention Médicale.

II-2 Matériels et réactifs de laboratoire

II-2-1 Matériels de laboratoire

- Feuilles séchées d'*A. annua*
- Micropipettes de 10, 20, 100, 200 et 1000 microlitres
- Des pipettes de 10, 25 et 50 ml
- Mortier
- Pulvérisette 5
- Spectromètre
- Des filtres à 0,45µm de porosité
- Tubes eppendorfs de 0,1 ; 0,2 et 0,5 ml
- Un appareil de lecture des plaques de microtitration : Fluoroskan
- Une hotte à flux laminaire
- Un aspirateur
- Une centrifugeuse pouvant utiliser des plaques de microtitration
- Un réfrigérateur à 4°C et un congélateur à \square 20°C
- Une étuve programmée à 37°C
- Cloche à bougie
- Un mélange de gaz composé d'azote (94%), d'oxygène (1%) et de gaz carbonique (5%)
- Un microscope optique et des lames
- Des plaques de microtitration à fond noir
- Des plaques de microtitration à fond clair
- Du papier aluminium simple
- Du papier aluminium adhésif
- Des tubes coniques stériles (Falcon) de 25 et 50 ml
- Des gants stériles
- Bubbles pour la culture

II-2-2 Réactifs de laboratoire

- Eau distillée stérile
- Milieu de culture RPMI-1640
- HEPES
- Hypoxanthine
- Solution de gentamycine
- Solution de bicarbonate de sodium
- Sérum humain inactivé à la chaleur
- Albumax I et II
- Solution de DAPI dilué au 1/75^{ème}
- Ethanol à 70°C
- Ethylène Bisstéaramide

III- Méthodologies

III-1 Critères d'inclusion et critères d'exclusion

Seuls les malades hébergeant *P. falciparum* ont été sélectionnés en tenant compte des critères d'inclusion et d'exclusion de l'OMS suivants, avec une approbation du Comité d'Ethique du Ministère de la Santé du Sénégal

III-1-1 Les critères d'inclusion

Les critères d'inclusion sont les suivants :

- Une infection à *P. falciparum* uniquement, confirmée par une goutte épaisse
- Une densité parasitaire comprise entre 1000 à 100000 formes asexuées/ μ l de sang pour les régions à transmission faible à modérée et entre 2000 et 200000 formes asexuées/ μ l de sang pour les régions où la transmission est élevée
- Une absence de signes généraux de danger chez les enfants de moins de cinq ans ou d'autres signes de paludisme à *P. falciparum* grave et compliqué tels que définis actuellement par l'OMS
- Une température axillaire $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$
- Une absence d'antécédents de réactions d'hypersensibilité aux médicaments évalués

Les patients sélectionnés seront suivis cliniquement et parasitologiquement pendant 30 jours avec une consultation et un examen parasitologique à J0, J1, J2, J3, J7, J17, J21 et J28

III-1-2 Les critères d'exclusion

Les critères d'exclusion sont les suivants :

- Absence de consentement du malade ou de ses parents ou de ses tuteurs
- Un accès difficile au centre de santé
- Critères d'exclusion propres à certains médicaments
- Grossesse et allaitement

III-2 Procédures de consentement

Quand le patient présente une goutte épaisse positive, il lui est proposé de faire partie de l'étude. Une fiche de consentement confectionnée à cet effet et traduite en français et en wolof sera remise au patient ou à son responsable légal par le médecin. Elle est signée par le patient et par l'investigateur. Les parents de mineurs sont sollicités pour permettre le recrutement de leurs enfants. Aucun prélèvement n'est effectué avant l'obtention du consentement éclairé du patient ou du responsable légal du patient. Pour conserver la confidentialité des inclus, un code connu seulement par les responsables de l'étude est utilisé en guise d'identification. Cette étude a été approuvée par le Comité d'Ethique du Ministère de la Santé et de la Prévention Médicale.

III-3 Détermination de la parasitémie

Une première lecture est faite en urgence au niveau du poste de santé, suivie d'une seconde au laboratoire pour comparer les résultats. Le nombre de parasites par microlitre (μl) de sang ou densité parasitaire était calculé en comptant le nombre de parasites asexués pour 200 leucocytes. On estime que le nombre moyen de leucocytes par μl de sang est de 8000. Le rapport du nombre de parasites pour 200 leucocytes était ensuite multiplié par 8000 pour obtenir la parasitémie. Le prélèvement était considéré comme négatif si aucun parasite n'était détecté après lecture d'environ 200 champs au microscope.

III-4 Prélèvements sanguins

Les prélèvements (5ml de sang) sont conservés dans des sacs thermostats munis d'accumulateurs puis acheminés au laboratoire de biologie moléculaire à l'hôpital Aristide Le Dantec pour la réalisation des tests de chimiosensibilité (DELI et DAPI test).

III-5 Les différentes méthodes

Dans cette étude, nous avons utilisé trois techniques, le DELI-test, le DAPI-test et le LIBS.

III-5-1 Le DELI-test

Le DELI-test est constitué de deux parties intimement liées : la culture parasitaire et le DELI-test proprement dit.

III-5-1-1 La culture parasitaire

Les isolats arrivés au laboratoire sont immédiatement mis en culture avant un délai de 8 heures de temps. Mais avant la culture, le sang est lavé. Brièvement le sang parasité est centrifugé à 2000 tours pendant 10 minutes pour séparer le culot globulaire du plasma. Le sérum obtenu est recueilli dans des tubes « Nunc » et congelé à -20°C pour d'autres études. Le culot globulaire obtenu est ensuite lavé 2 fois avec du RPMI-1640 et la parasitémie est ajustée si nécessaire entre 0,5 et 1% avec des hématies d'un donneur sain. Enfin un dernier lavage est fait avec du RPMI-1640 supplémenté avec 0,5% d'Albumax et 1 mg/l d'hypoxanthine. Le sang, une fois prêt, est mis en culture en microplaques de 96 trous avec du RPMI-1640 supplémenté avec de l'Albumax en présence de concentrations décroissantes de tisane de 48 $\mu\text{mol/l}$ à 0,187 $\mu\text{mol/l}$. Deux trous sans tisane servent de contrôle de culture et le dernier trou contenait le sang sain non parasité. Chaque isolat est testé en duplicate. La culture est effectuée pendant 48 heures à 37°C dans une cloche à bougie (5% de CO₂). Après les 48h, les plaques sont sorties et congelées à -20°C jusqu'à la réalisation du DELI-Microtest.

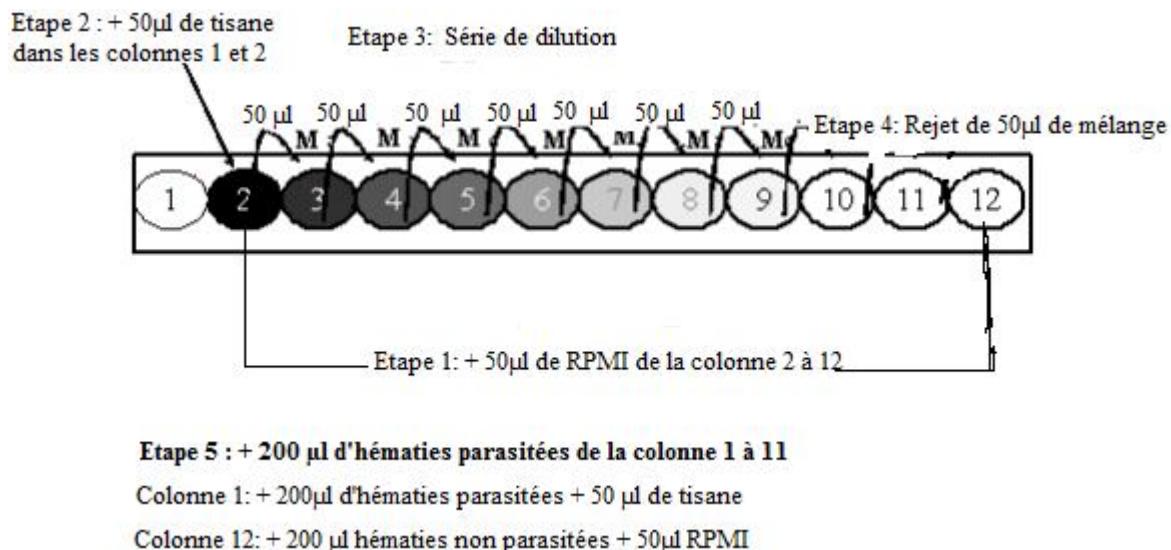


Figure 14 : Dilution des plaques de culture pour le DELI

III-5-1-2 Le DELI-test proprement dit

i-Principe

Après 48 heures de culture, les plaques sont sorties de l'étuve et on passe au DELI-test. C'est une méthode basée sur la mesure du taux de Lactate Déshydrogénase (LDH) parasitaire. La teneur en LDH parasitaire est proportionnelle à la croissance de *P. falciparum* cultivé *in vitro*. Ce taux est mesuré au moyen d'une technique immunoenzymatique en double sandwich décrite par Druilhe (**Druilhe et al, 2001**). Cette technique utilise deux anticorps monoclonaux Mab 17EA et Mab 19G7 dirigés contre deux épitopes de ce LDH parasitaire.

ii-Mode opératoire

Il est constitué de deux parties : le cotage et saturation des plaques et la réalisation du DELI-microtest

ii-1 Cotage et saturation des plaques

Les plaques de microtitration de 96 puits ont été cotées et sur lesquelles a été fixé l'anticorps Mab 17E à 1 μ g/l dilué dans du tampon PBS (Phosphate-Buffered Saline) pH 7,4 à 12h de temps à 4°C. Les plaques sont ensuite lavées 2 fois avec du PBS-BSA (Bovin Serum Albumin) à 1%. Par la suite 300 ml de PBS-BSA à 1% est répartis dans les puits et laisser 4 heures de temps à température ambiante. Enfin les plaques sont vidées et emballées dans du papier aluminium au maximum 8 jours.



Figure 15 : Plaque saturée recouverte de papier d'aluminium

ii-2 Réalisation du DELI-microtest

Les plaques de cultures sont congelées et décongelées 3 fois pour lyser les hématies. On dépose ensuite 100 µl de surnageant de culture dans les plaques cotées et saturées. Après incubation à 37°C pendant une heure, les plaques sont lavées 3 fois avec du PBS-BSA à 1%. On dépose ensuite l'anticorps Mab 19G7 biotinylé dilué (1/4000) dans du PBS-BSA. Après 1 heure d'incubation à 37°C les plaques sont lavées 3 fois avec du PBS-BSA. On ajoute une solution de streptavidine marquée à la peroxydase et après une incubation de 30 minutes à température ambiante, les plaques sont lavées 3 fois avec du PBS-BSA 1%. La révélation de la peroxydase est réalisée par un mélange à parties égales de tétraméthylbenzidine et d'eau oxygénée à 0,02%. La réaction enzymatique est arrêtée après 5 minutes par addition de 100 µl par puits d'acide phosphorique 1M. L'intensité de la coloration jaune obtenue est évaluée en densité optique (DO) à 450 nm avec un spectrophotomètre (StatFax-2100, Awareness Technology INC). Le test est interprétable quand la DO du puits témoin dépourvu de tisane est comprise entre 0,4 et 1,5. Au-delà de cette valeur l'hémolysât doit être dilué.

L'interprétation des résultats est basée sur la densité optique (DO). La densité optique est proportionnelle à la quantité de LDH parasitaire. Les résultats des tests sont exprimés en concentration minimales inhibitrices à 50% (CI_{50}) qui est la concentration de tisane qui inhibe de moitié la croissance du parasite. Les CI_{50} étaient calculées à partir de la courbe dose/DO par le logiciel GraphPad Prism 4.



Figure 16 : Une photo de spectrophotomètre

III-5-2 Le DAPI-test

Comme le DELI-test, le DAPI-test est constitué de deux parties intimement liées : la culture parasitaire et le DAPI proprement dit.

III-5-2-1 La culture parasitaire

Les isolats de sang, arrivés au laboratoire, sont mis immédiatement en culture. Mais avant la culture, comme au DELI-test, le sang est lavé. Les prélèvements de sang sont centrifugés pour séparer le culot globulaire du sérum. Le sérum est ensuite aspiré et mis dans des tubes « Nunc » pour des études immunologiques. Le culot globulaire obtenu est ensuite lavé deux fois avec du RPMI-1640. Le sang, une fois prêt, 180 μ l de culot de globules rouges parasités est mis dans des puits spécifiques en utilisant une pipette multichannel en présence de concentrations décroissantes de tisane, de 48 μ mol/l à 0,187 μ mol/l. Deux puits sans tisane servent de contrôle. Les plaques de microtitration sont ensuite mises dans des dispositifs spéciaux (Bubbles) à travers lesquels nous faisons circuler un mélange spécial de gaz (94% de N₂, 5% CO₂, et 1% O₂) pendant 30 secondes. Finalement, le dispositif est placé à l'incubateur à 37°C pendant 48 heures. Chaque isolat est testé en duplicate. Au bout de 48 heures, on prélève sur les puits sans tisane pour vérifier si la culture a réussi. Cette réussite se matérialise par des parasites au stade trophozoite. Mais aussi la lame nous permettra de

vérifier s'il n'ya pas de contamination. Les plaques de culture sont sorties et congelées à 20°C jusqu'à la réalisation du DAPI-test.

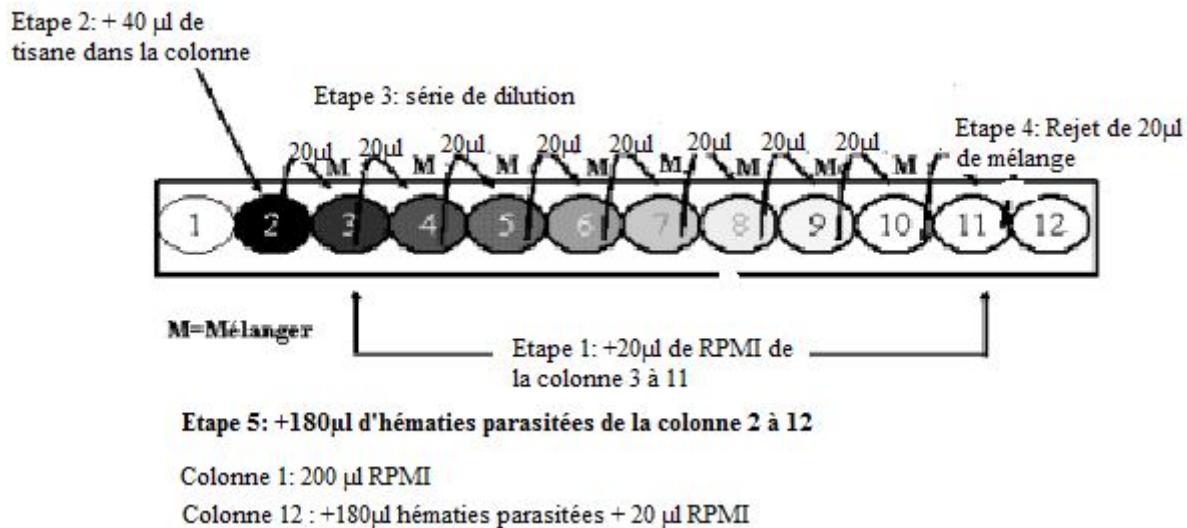


Figure 17 : Dilution des plaques de culture pour le DAPI

III-5-2-2 Le DAPI-test proprement dit

Le DAPI (Di Amidino Phénol Indol) est un produit fluorescent qui appartient au groupe indole. Il est utilisé dans la détermination de la sensibilité des souches de *P. falciparum* par rapport aux différents antimalariques (tisane dans notre étude).

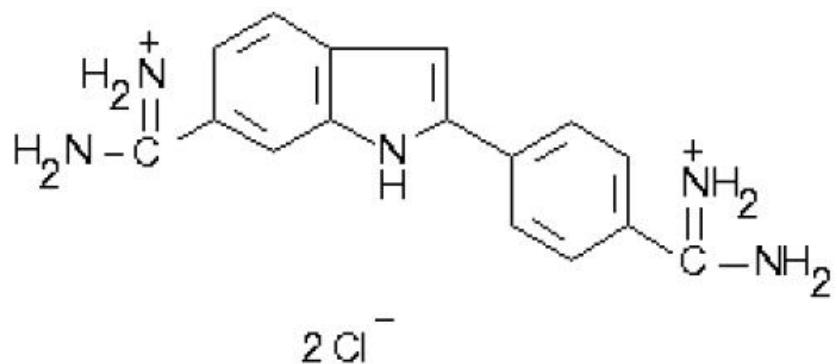


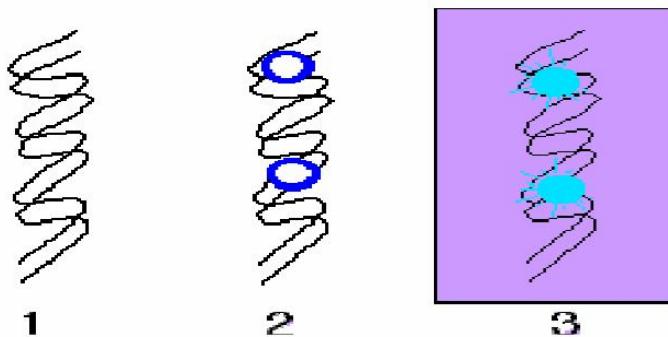
Figure 18 : Structure chimique du DAPI (Ndiaye *et al*, 2010)

i-Principe du DAPI-test

Le DAPI se fixe spécifiquement sur l'ADN du parasite. Eclairé en lumière ultraviolette (max 355 nm) lors de la lecture de la plaque de microtitration avec le

Fluoroskan®, le DAPI émet une fluorescence bleue (max 460 nm). Comme tout fluorochrome, il est caractérisé par deux spectres :

- Un spectre d'absorption lumière incidente
- Un spectre d'émission de fluorescence



ADN	Fixation du	Action de l'UV qui entraîne
Double brin	DAPI	une fluorescence bleu

Figure 19 : Fixation du DAPI sur l'ADN et action de la lumière ultraviolette
(Ndiaye et al, 2010)

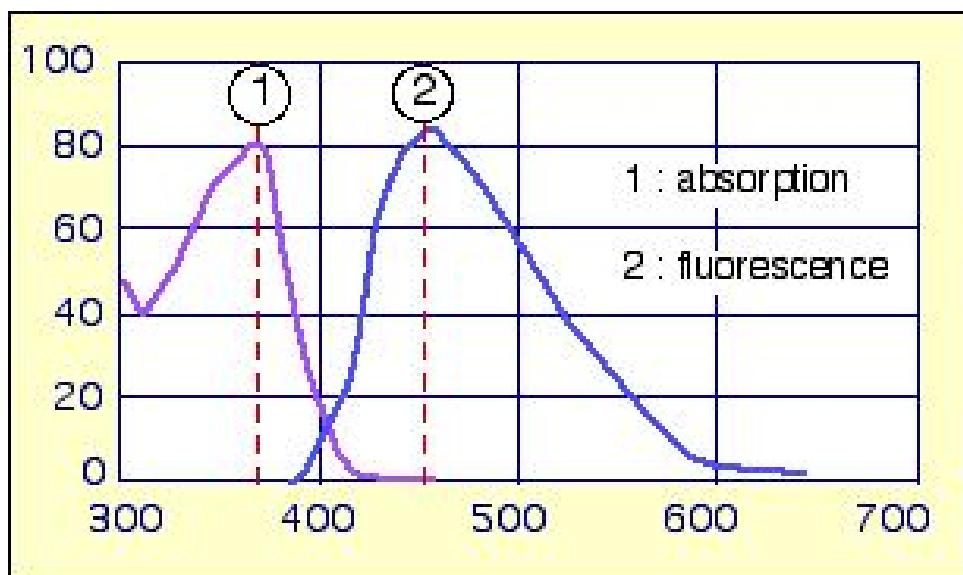


Figure 20 : Absorption des radiations violettes max 355 nm et restitution d'une fluorescence bleue max 460 nm (Ndiaye et al, 2010)

ii-Mode opératoire

Après 2 jours de culture, les plaques sont sorties de l'incubateur. Elles sont centrifugées à 4000 tours/mn pendant 30 mn puis le surnageant est enlevé. Ensuite, dans l'obscurité, 100 µl de DAPI sont ajoutés dans chaque puits puis mixés à l'aide de la pipette multi chanel. Un couvercle en aluminium est appliqué au dessus de la plaque qui est gardé à l'obscurité dans la hotte pendant 30 minutes. Au bout d'une demi-heure, la plaque est centrifugée pendant 30 minutes à raison de 4.000 tours/mn. Les plaques sont sorties avec délicatesse de la centrifugeuse puis le surnageant est enlevée. Ajouter 200 µl de 1xPBS dans chaque puits à l'aide d'une pipette multi chanel puis mélanger. La plaque est prête pour être lue au Fluoroskan. Mais il faut toujours couvrir les plaques avec du papier aluminium jusqu'à leur lecture. La lecture est faite au Fluoroskan avec une longueur d'onde de 358/461 nm. Si la lecture n'est pas possible dans l'immédiat, recouvrir toutes les plaques de feuilles d'aluminium adhésives et les conserver à -20°C .Par ailleurs il faut noter qu'il est nécessaire de ramener la température des plaques à celle ambiante avant toute lecture.

La lecture des plaques au Fluoroskan après traitement se fait grâce à un dispositif automatique comportant le Fluoroskan proprement dit, couplé à ordinateur muni des logiciels suivants : Ascent Fluorescan et GraphPrism. Ici, le logiciel Ascent Fluorescan est utilisé pour la lecture alors que le GraphPrism permet le traitement des données obtenues (figure 21) pour en tirer les valeurs de CI_{50} .

DROGUES + SANG PARASITE

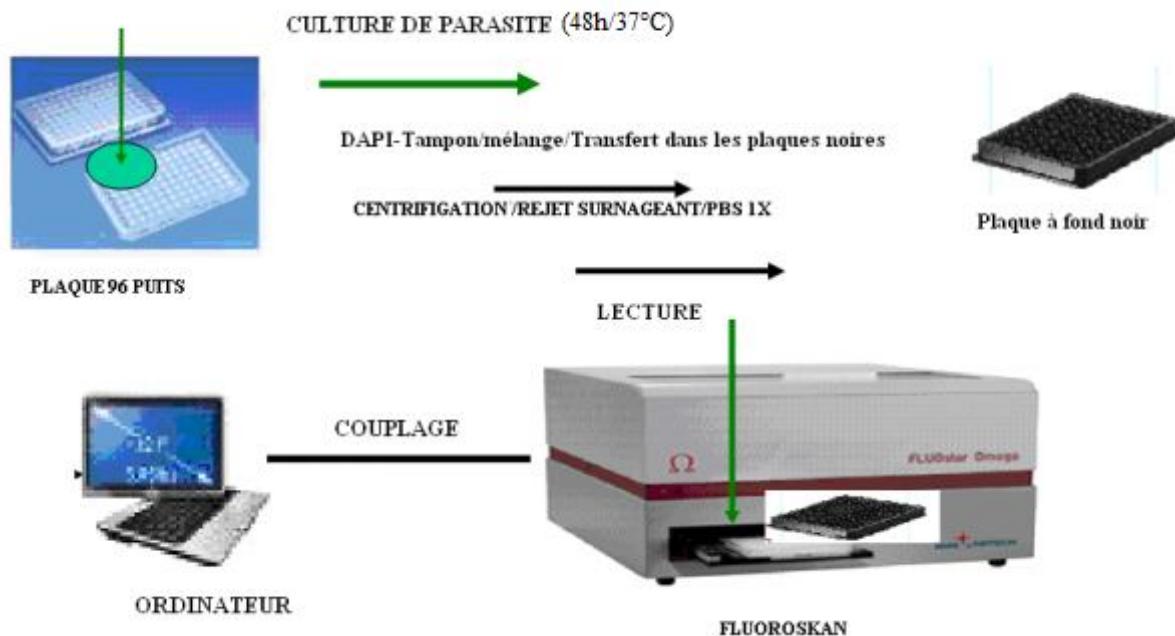


Figure 21: Préparation et lecture des plaques après 48h d'incubation

III-5-3 La technique du « Laser-Induced Breakdown Spectrometer » (LIBS)

III-5-3-1 Principe du LIBS

La technique du LIBS consiste à focaliser un laser de forte puissance sur la surface d'un échantillon. L'interaction laser/matière crée un plasma composé d'espèces excitées, qui vont émettre de la lumière lors du refroidissement de celui-ci, en retournant à leur état initial. Cette lumière est alors collectée puis acheminée vers des spectromètres qui permettent d'analyser les spectres d'émission afin d'identifier chacune des espèces présentes dans l'échantillon analysé. Le LIBS est donc une des méthodes de spectroscopie active d'émission atomique qui permet de déterminer la composition élémentaire d'un échantillon. La technique du LIBS nécessite trois étapes :

- L'ablation laser, qui grâce aux impulsions successives du laser, consiste à vaporiser la surface de l'échantillon jusqu'à la naissance du plasma, avec création d'un cratère

- L'émission optique du plasma, lors de la désexcitation des espèces ionisées du plasma. Cette émission comporte une composante continue et des raies fines caractéristiques des espèces émettrices
- L'analyse spectroscopique du signal émis par le plasma, qui consiste à décomposer et enregistrer le spectre de la lumière du plasma, afin de déterminer les éléments présents dans l'échantillon, et ainsi déduire sa composition élémentaire.

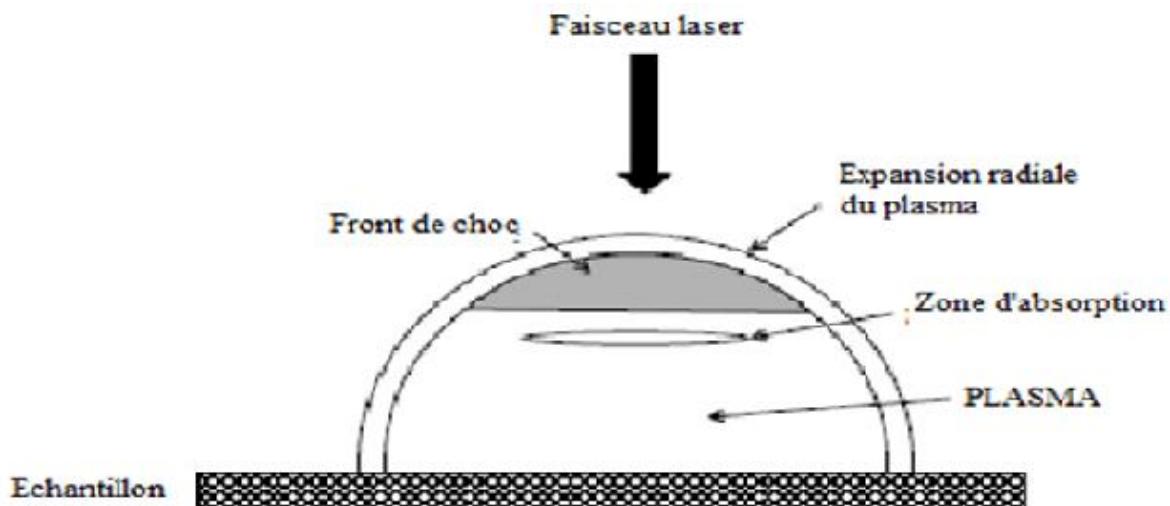


Figure 22 : Schéma d'un plasma créé à la surface d'une cible solide

III-5-3-2 Mode opératoire du LIBS

Dans le cas de notre étude, les échantillons sont les feuilles séchées d'*A. annua* et de *Camellia sinensis*. Les échantillons sont séchés à plus de 80°C jusqu'à obtenir une masse compacte. Les échantillons chauffés, sont broyés par un mortier jusqu'à avoir un bloc d'épaisseur de 120µm. Ils sont ensuite homogénéisés par une « pulvérisette 5 ». Sous forme de mélange, les échantillons sont réluis par de l'éthylène bisStearamide (HWC), avec une proportion de 1g de tisane pour 10% de HWC. Le mélange est une nouvelle fois homogénéisé avec une « pulvérisette 5» avec une force de pression de près de 5 tonnes dans un disque en boulette de 32 mm de diamètre. Les disques en boulette sont placés dans la chambre d'échantillon.

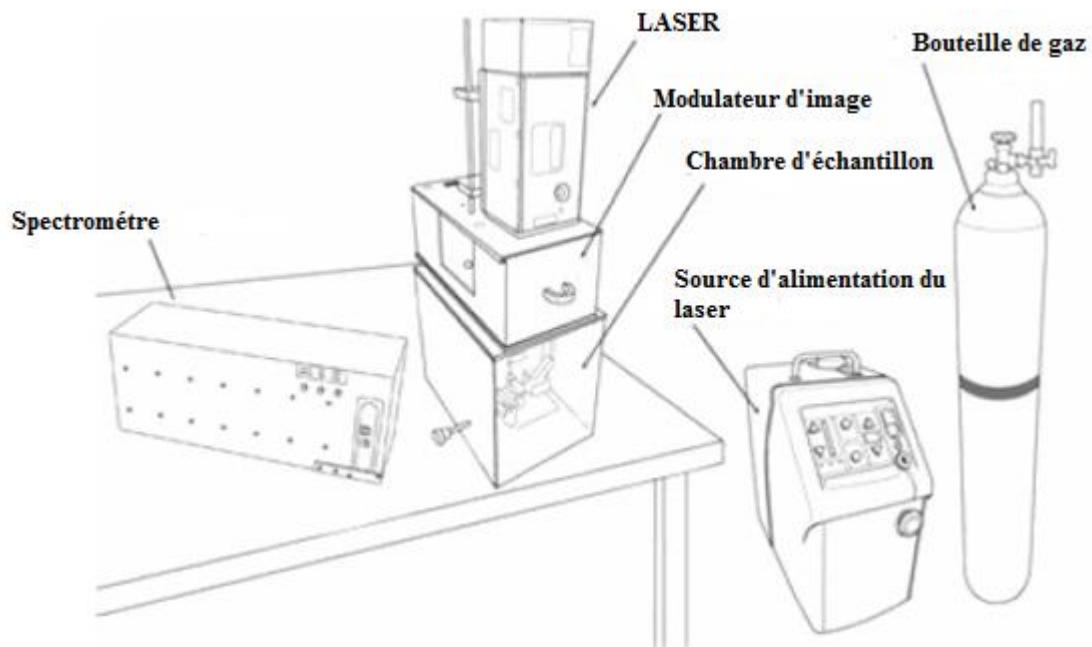


Figure 23: Dispositif du LIBS avec éléments non branchés

Ainsi ces diques seront soumis à des bombardements du laser. Un plasma va se former autour des disques contenant nos feuilles séchées d'*A. annua* et de *C. sinensis* placées dans la chambre d'échantillons. En se refroidissant le plasma émet de la lumière qui sera acheminée vers le spectromètre qui permet d'analyser les spectres d'émission afin d'identifier chacun des éléments présents dans l'échantillon analysé. Les différents éléments vont se présenter sous formes de pics différents.

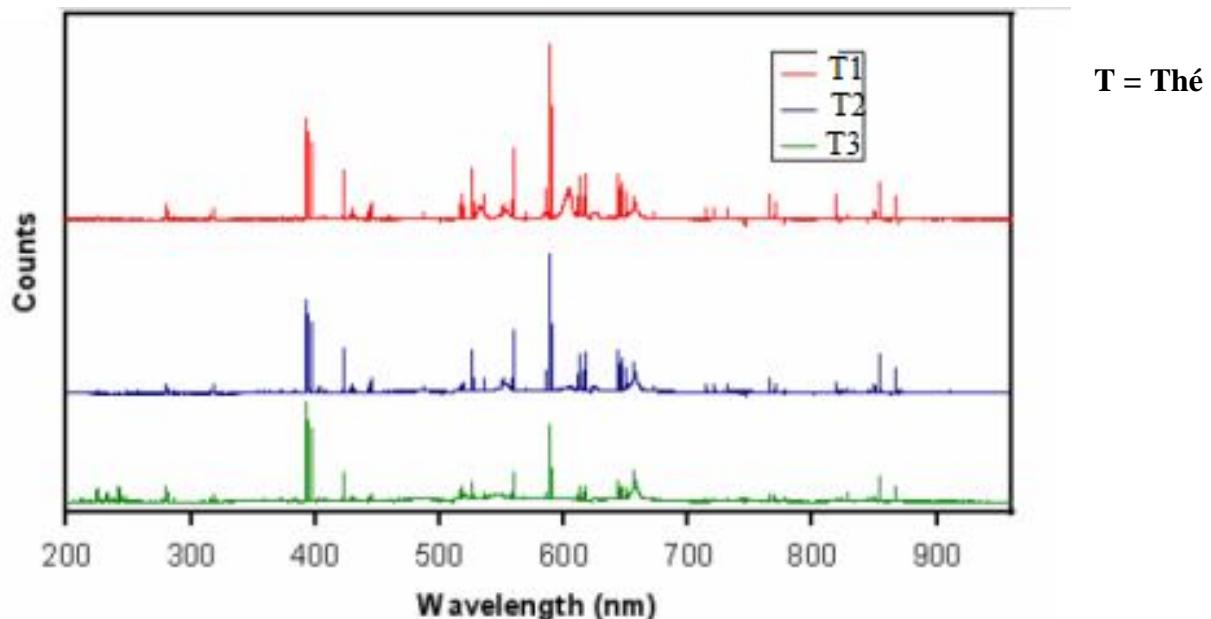


Figure 24 : Spectres d'émission des éléments

CHAPITRE III:

Résumés et Discussions des articles

Résumé et discussion de la thèse : Etude de la chimiosensibilité *ex vivo* des souches de *Plasmodium falciparum* à la tisane d'*Artemisia annua* et caractérisation des éléments minéraux contenus dans les feuilles de la plante

Ce travail a été réalisé grâce à une collaboration mise en place en 2008 entre la section Malaria du Laboratoire de Biologie Moléculaire et l'Organisation Non Gouvernementale (ONG) luxembourgeoise IFBV. Le Dr Pierre Lutgen, fervent combattant des maladies tropicales, s'est vite intéressé par notre étude et s'est proposé de trouver un financement qui a permis cette étude. En ce moment, **Arcelor Mittal**, compagnie métallurgique, présente à l'est du Sénégal, avait dans son programme, un financement d'un projet social consistant à la lutte contre le paludisme dans cette localité. C'est par la suite, après des tractations du Dr Lutgen, notre étude a été financée par Arcelor Mittal.

En Afrique en général et au Sénégal en particulier le paludisme continue d'être un problème de santé publique, malgré tous les moyens de lutte mis en place. Cette situation pourrait être due, d'une part, à la résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques et des moustiques aux insecticides, mais d'autre part à l'inaccessibilité des populations aux médicaments.

Les populations vivant dans les zones reculées, desservies en système de santé, sont souvent victimes du paludisme, faute ou manque de médicaments et /ou d'inaccessibilité aux structures sanitaires. Pour résoudre ce problème, l'utilisation de médicament, peu onéreux, à bon marché et accessible à toutes les franges de la société serait une aubaine dans la lutte contre le paludisme. L'*A. annua*, plante ubiquiste, cultivable presque sur toutes les latitudes et utilisée en Chine depuis plus de 2000 ans, pourrait être une alternative de lutte contre le paludisme pour ces populations éloignées mais aussi pour celles à revenus financiers limités. C'est ainsi que nous avons jugés d'utiliser l'armoise dans la lutte contre le paludisme au Sénégal. Bien qu'avéré efficace contre le paludisme par plusieurs études (**Willcox et al, 2004**), l'utilisation *in vivo* de l'*A. annua* au Sénégal doit être précédée d'études *ex vivo* pour démontrer d'abord son efficacité au Sénégal. C'est dans cette optique que nous avons mené, sous l'approbation du Comité Ethique du Ministère de la Santé et de la Prévention Médicale, une étude de chimiosensibilité *ex vivo* des souches de *P. falciparum* à la tisane d'*A. annua* couplée à une détermination des éléments minéraux contenus dans les feuilles de la plante.

Cette étude s'est réalisée :

- Au laboratoire de Parasitologie de l'hôpital Aristide Le Dantec sous la direction du Pr Daouda NDIAYE
- A l'Institut de Technologie Nucléaire Appliquée (ITNA) de l'UCAD sous la direction du Dr Mouhamadou DIALLO

Le matériel de travail, c'est-à-dire les feuilles séchées d'*A. annua*, nous provient de l'ONG Luxembourgeoise. Le taux d'artémisinine contenu dans cette tisane a été déterminée au Luxembourg. Au laboratoire, l'infusion a été faite d'après un protocole **de Rath (Rath et al, 2004)**, qui a permis de calculer les concentrations d'artémisinine après infusion. C'est à partir de ces concentrations que les différentes dilutions ont été faites mais aussi la caractérisation des éléments minéraux de la tisane d'*A.annua*. Les résultats obtenus ont fait l'objet de publications qui seront présentées dans les pages suivantes. Concernant l'étude de la chimiosensibilité *ex vivo* par la méthode du DAPI-test, les résultats obtenus récemment sont soumis pour publication. Cette partie « Résultats et discussions » comportera donc :

- **Publication 1:** *Tea Artemisia annua inhibits Plasmodium falciparum isolates collected in Pikine, Senegal*
 - **Publication 2:** *DAPI - test for evaluation ex vivo susceptibility on Plasmodium falciparum isolates collected in Thiès, Senegal to Artemisia annua*
 - **Publication 3:** *Characterization of element and mineral content in Artemisia annua and Camellia sinensis leaves by handheld X-ray Fluorescence.*

Résumé et discussion de publication 1: *Tea Artemisia annua inhibits Plasmodium falciparum isolates collected in Pikine, Senegal*

Gueye Papa El hadji Omar, Diallo Mouhamadou, Deme Awa Bineta, Badiane Aida Sadikh, Dior Diop Mare, Ahouidi Ambroise, Abdoul Aziz Ndiaye, Dieng Thérèse, Lutgen Pierre, Mboup Souleymane, Sarr Ousmane

Les plantes médicinales sont utilisées dans le traitement de la malaria et des autres maladies bien avant Jésus Christ (Willcox *et al*, 2004). Dans le monde, après l'eau les tisanes constituent la boisson la plus consommée avec 20 milliards de tasses quotidiennement. On estime qu'environ 80% de la population mondiale utilisent les plantes médicinales pour leur traitement (Zirihi *et al*, 2005). On ne peut pas parler de santé en Afrique sans parler des plantes médicinales. Mais des études scientifiques sur l'efficacité des plantes médicinales sont peu nombreuses dans la littérature. Au Sénégal, en 2008, une revue de la littérature, avait montré que pratiquement aucune étude n'a été faite sur l'efficacité *in vitro* et *in vivo* de l'*A. annua* sur le paludisme. C'est ainsi que nous avons jugé nécessaire d'entreprendre d'abord une étude pilote sur l'efficacité *in vitro* de la tisane d'*A. annua* sur le paludisme, qui nous a donné des résultats probants. En 2009, nous avions réalisé une étude sur la chimiosensibilité *ex vivo* des souches de *P. falciparum* de Pikine par rapport à la tisane d'*A. annua*. Le choix de Pikine était basé sur le fait que, Pikine, zone endémique, présente une forte population démographique, mais aussi une forte transmission du paludisme due à la présence d'eaux stagnantes causées par une nappe phréatique superficielle.

Des prélèvements sanguins ont été faits dans le Poste de Santé Touba Diacksao situé dans la localité de Pikine. Le sang obtenu est acheminé au laboratoire de Parasitologie et de Mycologie de la FMPOS. Les isolats arrivés au laboratoire sont immédiatement mis en culture dans un délai de 8 heures de temps. Mais avant la culture, le sang est lavé. Brièvement le sang parasité est centrifugé à 2000 tours pendant 10 minutes pour séparer le culot globulaire du plasma. Le sérum obtenu est recueilli dans des tubes « Nunc » et congelé à - 20°C pour d'autres études. Le culot globulaire obtenu est ensuite lavé 2 fois avec du RPMI-1640 et la parasitémie est ajustée si nécessaire entre 0,5 et 1% avec des hématies d'un donneur sain. Enfin un dernier lavage est fait avec du RPMI-1640 supplémenté avec 0,5% d'Albumax et 1 mg/l d'hypoxanthine. Le sang, une fois prêt, est mis en culture en microplaques de 96 puits avec du RPMI1640 supplémenté avec de l'Albumax en présence de concentration décroissantes de

tisane de $48 \mu\text{mol/l}$ à $0,187 \mu\text{mol/l}$. Deux puits sans tisane servent de contrôle de culture et le dernier puits contenait le sang sain non parasité. Chaque isolat est testé en duplicate. La culture est effectuée pendant 48 heures à 37°C dans une cloche à bougie (5% de CO₂). Après les 48h, les plaques sont sorties et congelées à -20°C jusqu'à la réalisation du DELI-Microtest.

L'activité antiplasmodiale a été évaluée en utilisant une technique immunoenzymatique, le DELI-Test (Confert méthodologie DELI), sur des souches chloroquino-sensibles (3D7), chloroquino-résistantes (W₂) mais aussi sur des souches de terrain.

Les données ont été saisies sur Excel et les analyses statistiques ont été faites par le biais du logiciel STATA version 9 (Collège Station, TX, USA). Le résultat était considéré comme statistiquement significatif quand la valeur du test de probabilité P était inférieure à 0,05 (= 5%).

La population d'étude est composée de 40 patients dont 33 sont de sexe masculin et 7 de sexe féminin. Les âges varient entre 12 et 60 ans avec cependant une moyenne d'âge de 25,3 ans. La température et la parasitémie moyennes sont respectivement $38,2^\circ\text{C}$ et 15955 parasites/ μl de sang.

Les résultats obtenus ont montré une moyenne de CI_{50} égale à $0,095 \mu\text{g/ml}$. Cependant 36 échantillons (90%) ont des CI_{50} inférieures à $0,5 \mu\text{g/ml}$, un seul (2,5%) a une CI_{50} supérieure à $0,5 \mu\text{g/ml}$ et trois (3) échantillons seulement ont donné des résultats ininterprétables correspondant à un pourcentage de 7,5% pour la tisane. Ces résultats ininterprétables pourraient être dus à la présence de plusieurs souches sur notre échantillon mais aussi des erreurs lors de la manipulation. Aucune corrélation n'a été observée entre la densité parasitaire et les CI_{50} , avec $P=0,981 > 0,05$.

Concernant les souches de références, des CI_{50} de $0,146 \mu\text{g/ml}$ et $0,394 \mu\text{g/ml}$ ont été observées respectivement pour les souches 3D7 et W₂ montrant la sensibilité de notre tisane.

Si nous cherchons dans la littérature des valeurs de référence pour notre CI_{50} tel qu'exprimé à $0,095 \mu\text{g/ml}$, nous trouvons une valeur fort acceptable. Une étude faite en Tanzanie a montré que les fortes activités antiplasmodiales de la tisane d'*A. annua* et autres plantes médicinales étaient observées pour des CI_{50} inférieures à $0,5 \mu\text{g/ml}$ (**Malebo et al, 2009**). Ceci permettrait de dire que notre tisane aurait une forte activité antiplasmodiale. Une étude faite au Brésil sur

cinquante plantes montre de très bonne activité antipaludique *in vitro* avec des $IC_{50} < 10 \mu\text{g/ml}$ (**Batista et al, 2009**).

Notre tisane Luxembourgeoise aurait une forte activité antiplasmodiale, et bien qu'elle ne soit pas trop riche en artémisinine, comparée aux autres tisanes comme par exemple celle du Brésil. Ceci laisserait penser que cette forte activité antipaludique de la tisane luxembourgeoise serait due, non seulement à l'artémisinine seule, mais à l'effet combiné d'autres substances qui s'y trouvent (coumarine, scopolétines, phénols, flavonoïdes, camphres, microéléments, etc.). L'effet de synergie potentialisante de l'artémisinine par les flavones a été décrit par **Elford dès 1987**. D'autres espèces d'artémisia contiennent en concentrations supérieures des coumarines de différentes formules, telles que la scopolétine ou la daphnetine. Les coumarines, à côté de leur rôle spécifique sur le système immunitaire et sur le plasmodium et les schizontes (**Yang et al, 1992**), sont également connues comme chélateurs de métaux, et notamment du fer, or le fer est un élément clef du paludisme et dans beaucoup d'autres maladies infectieuses. La curcumine, de même, à côté de ses nombreuses propriétés thérapeutiques est un excellent chélateur du fer. (**Mean, 2009**).

Par ailleurs d'autres études faites sur d'autres plantes médicinales ont montré de bons résultats. Une étude faite en Bolivie sur une série de plantes a montré une IC_{50} de $9 \mu\text{g/ml}$ pour *Amburana osarensis*, essentiellement due à la coumarine (**Bravo et al, 2003**).

De même une étude faite au Brésil portant sur une cinquantaine de plantes (**Batista et al., 2009**) montre que parmi celles-ci un grand nombre ont des propriétés antipaludiques équivalentes ou meilleures que *l'A. annua*.

Ce travail est publié dans le journal African Journal of Biochemistry Research

Full Length Research Paper

Tea *Artemisia annua* inhibits *Plasmodium falciparum* isolates collected in Pikine, Senegal

Gueye Papa El hadji Omar¹, Diallo Mouhamadou^{1*}, Deme Awa Bineta¹, Badiane Aida Sadikh^{1,2}, Dior Diop Mare¹, Ahoudi Ambroise¹, Abdoul Aziz Ndiaye², Dieng Thérèse², Lutgen Pierre³, Mboup Souleymane¹ and Sarr Ousmane¹

¹Molecular Biology Unit, Bacteriology-Virology Laboratory at Aristide Le Dantec Hospital, 30 Pasteur Avenue, BP 7325 Dakar, Senegal.

²Department of Parasitology and Mycology, University Cheikh Anta Diop, Dakar, Senegal.

³Iwerliewen Fir Bedreete Volleker, Luxemburg NGO, Luxemburg.

Accepted 5 July, 2012

Malaria is a major scourge of most countries in Africa which continues to defy science and technology. Several medicinal plants are traditionally used for the treatment of malaria and other protozoa infections. We aimed to assess by the Double-site Enzyme-linked Lactate dehydrogenase enzyme Immuno-detection (DELI) test for the first time in Senegal, *Plasmodium falciparum* isolates *in vitro* susceptibility to Tea *Artemisia annua* (TAA). In total, 40 field isolates have been tested and the mean IC₅₀ was 0.095 µg/ml, while the IC₅₀ for the 3D7 and W2 laboratory adapted strains were 0.14 and 0.39 µg/ml, respectively. Tea *A. annua* sensitivity was not obtained for three isolates because of lack of growth. The results suggest that tea *A. annua* has potent antiplasmodial activity against *P. falciparum* strains collected in Pikine, Senegal.

Key words: *Artemisia annua*, enzyme-linked lactate dehydrogenase enzyme immuno-detection (DELI), *Plasmodium falciparum*, IC₅₀.

INTRODUCTION

The combination of tools such as long-lasting insecticidal nets, artemisinin-based combination therapies, indoor residual spraying and intermittent preventive treatment in pregnancy has had a great public health impact in terms of reduction of malaria-associated death and morbidity especially in sub-Saharan Africa. Despite this gain, the number of estimated malaria cases remains still important with 225 million with 781,000 deaths (World Malaria, 2010). Many of them have died for reasons such as being out of reach of health centers or because of the cost of

malaria treatment. This situation renders urgent the need to find ways to mitigate this problem. It is estimated that 80% of the world's population use herbal remedies to treat many illnesses and ailments (Zihiri et al., 2005). Additional reports shows that in the US, more than 158 million Americans spent US\$ 17 billion on herbal medicines, while more than 70% of Germans recognized using herbal products in the management of many health conditions (US Report, 2002; Tuffs et al., 2002). In developing countries, the figure is almost the same with 80%

*Corresponding author. E-mail: misbax@gmail.com or misbax@yahoo.co.uk. Tel: (221) 33 822 5919 / (221) 77 541 1957. Fax: (221) 33 821 6442.

Abbreviations: TAA, Tea artemisia annua; IC₅₀, 50% inhibitory concentration; RDT, rapid diagnostic test; DELI test, enzyme-linked lactate dehydrogenase enzyme immuno-detection.

of the people using herbal remedies (Verma and Singh, 2008). In Africa also, medicinal plants are used for the treatment of many ailments (Wafo et al., 1999; Nkeh et al., 2001; Noumi and Yomi, 2001; Dieye et al., 2008). In this line, one acknowledges that plants such as the neem in Africa and artemisinin in China have been used for many years as drugs against falciparum malaria. The interest on artemisinin extracted from *Artemisia annua* has grown up since resistance to most of the affordable antimalarials has spread around the world.

A. annua L. is a member of the Asteraceae family and has been used by Chinese since ancient times in traditional medicine against fever and malaria. Artemisinin is a cadinane-type sesquiterpene lactone with an endoperoxide bridge which is presently the most potent and efficacious compound against the late-stage ring parasites and trophozoites of *Plasmodium falciparum* (Brisibe, 2009), the causative agent of malaria. The plant produces a portfolio of bioactive compounds including flavonoids, coumarins, steroids, phenolics, purines, lipids, aliphatic compounds, monoterpenoids, triterpenoids and sesquiterpenoids. Thus far, the most important of the sesquiterpenoids seems to be artemisinin, dihydroartemisinic acid, artemisinic acid and arteannuin B which are stored in the glandular trichomes found in the leaves and inflorescence (Ferreira and Janick, 1995). The action of artemisinin derivatives is different from that of the other antimalarials. Artemisinins have a very fast action and parasite clearance times are much shorter than with other malarial drugs. Whereas, most of antimalarials work at the late trophozoites and schizont stages of the malaria parasite, artemisinin derivatives also act already at early trophozoites and ring stages.

Artemisinin acts on gametocyte development, resulting in decreased transmission in areas where artemisinin compounds are extensively used. Artemisinin is considered as the treatment of choice for malaria, and the WHO has called for an immediate halt to single-drug artemisinin preparations in favor of medications that combine artemisinin with another antimalarial, to reduce the risk of parasites developing resistance (WHO, 2006). Recently, the plant is introduced in Senegal and The Gambia and is grown in some areas where people have started to use it as herbal tea for malaria-like symptoms. To investigate whether the Tea *A. annua* has antiplasmodial effect, we studied its *in vitro* antimalarial activity on *P. falciparum* isolates collected from malaria patients at Pikine, Senegal. We used the DELL-microtest which is very sensitive allowing the measurement of drug response with very low parasite densities (0.005%) (Moreno et al., 2001).

MATERIALS AND METHODS

Study site and patients

The study samples were collected from malaria infected patients attending an outpatient clinic situated in Pikine (Figure 1) where

malaria transmission is highly seasonal with an entomologic inoculation rate ranging from 0 to 16.8 infective bites per person per year (Pages et al., 2008). Patients with peripheral blood smears positive for *P. falciparum*, with non-complicated malaria, aged 5 years or greater were invited to participate in the study as previously reported (Thomas et al., 2002; Sarr et al., 2005). They were excluded in case of complicated malaria, pregnancy and recent history of antimalarial treatment.

Artemisia annua dried leaves

Leaves of *A. annua* were graciously provided by Dr Pierre Lutgen and colleagues from Iwerliewen Fir Bedreete Volleker (IFBV), Luxembourg. They were dried under shade in Luxembourg before being sent to Dakar in paper bags weighting 20 g. They were then kept at room temperature until analyses. Chloroquine (CQ) was obtained from Sigma Chemical Co. (St Louis, Mo, USA).

Extraction method

We used the method described by Rath (Rath et al., 2004) which yields 70 to 76% of artemisinin. Briefly, 10 g of dried leaves of *A. annua* are weighed and put in a glass container. Then 1 L of warm water is added and the mixture is stirred up for 10 min and covered by a lid which is not of iron because the latter reacts easily with artemisinin and may decrease the output of the extraction. The solution is then filtered to collect the tea *A. annua*.

Inclusion and exclusion criteria

We recruited study participants in an outpatient clinic in Pikine. The principal criterion of inclusion was uncomplicated *P. falciparum* malaria diagnosed by malaria Rapid Diagnostic Test (RDT). Patients were excluded in the presence of another *Plasmodium* species or any signs of severe malaria.

Socio-demographic characteristics of the study population

In total, 40 patients were recruited and 33 of them were male. The mean age was 25.3 years (12 to 60) (Table 1). The mean temperature and parasite density were 37.9°C and 15,955 parasites/µL respectively.

Consent

In case of positive RDT, we proposed to any patient to participate in the study. A written consent form is translated into wolof for any patient or his legal guardian in case he/she can not read. The form is signed by the patient and the investigator. To preserve the confidentiality of the participants, we have used a code. The study was approved by the Ethics Committee of the Ministry of Health and the Medical Prevention.

Blood collection

For each patient, 5 to 10 ml of whole blood is collected onto ethylen diamine tetracetic acid (EDTA) vacutainer tubes which are kept at room temperature until they are conveyed to the laboratory for analyses.

Parasite culture

To validate our study, we tested our TAA, using field strains as well as two known laboratory strains 3D7, susceptible to CQ and W2, chloroquine-resistant. 3D7 is a clone from NF54 which was isolated

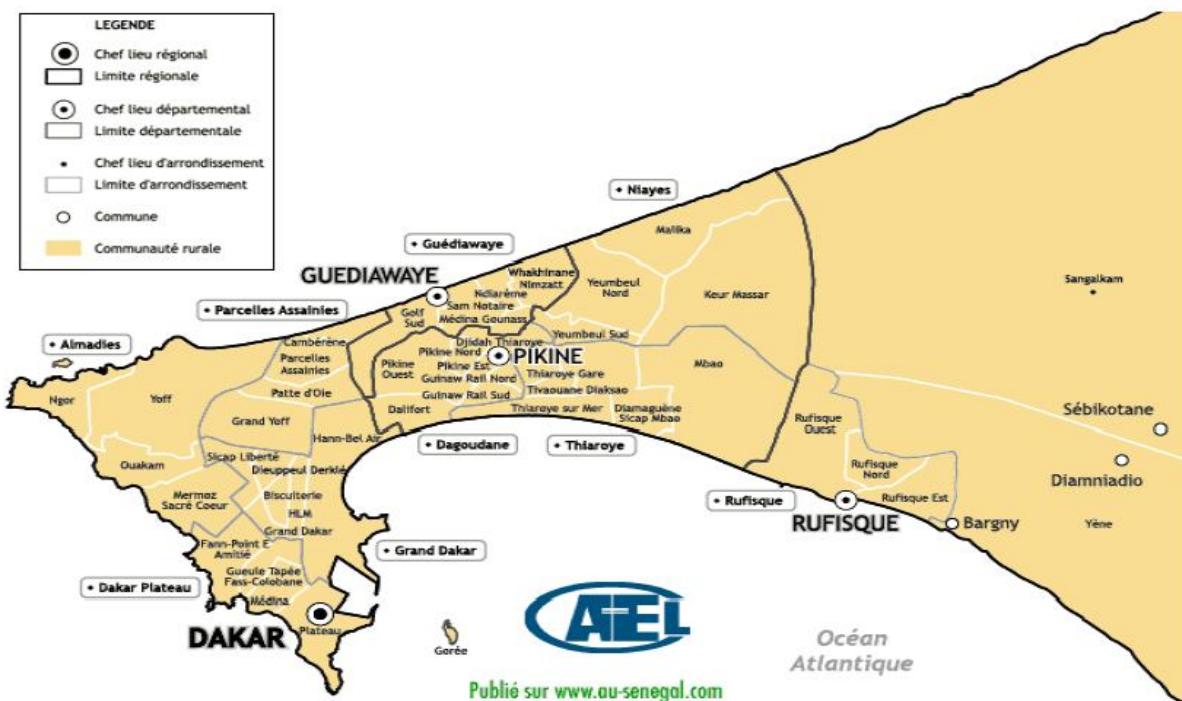


Figure 1. Administrative division of the region of Dakar, Senegal.

Table 1. Parasite density distribution based on the different age groups of our study population.

Different age groups (years)	Parasite density means (p/ μ L)
[12-15]	10739
[15-30]	18332.9
[30-60]	7390.1

from a patient who lived near Schipol Airport, Amsterdam, The Netherlands (Miller et al., 1993) while W2 was isolated from Indochina. Both strains are maintained in continuous culture in our laboratory.

When the isolates arrived in the laboratory, the parasitized blood sample is centrifuged at 2,000 rpm for 10 min. The plasma is collected in cryotubes and kept at -20°C. The pellet is washed twice with RPMI 1640 and the parasite load is adjusted between 0.5 and 1% with non-parasitized red blood cells. The last wash is done with supplemented RPMI 1640. The sample is put into 96-well microplates with supplemented RPMI 1640 along with tea *A. annua* at decreasing concentrations from 13.552 to 0.052 µg/ml. Two wells without tea *A. annua* are used as control. Each isolate is tested in duplicate. Parasites are allowed to grow during 48 h at 37°C in a candle jar after which, plates are taken out and frozen at -20°C until the DELI-test is performed.

The DELI-test

The test measures the amount of lactate dehydrogenase

(LDH) produced by the parasite. The level of *p*LDH is proportional to the growth of *P. falciparum* *in vitro*. This rate is measured by means of immuno-enzymatic technique in double sandwich as described by Druilhe (Druilhe et al., 2001). The technique uses two monoclonal antibodies Mab 17EA and Mab 19G7 directed against an epitope of *p*LDH.

Coating plates

The 96-wells plates were coated with Mab 17 at 1 µg/L diluted in phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4 for 12 h at 4°C and then washed twice with PBS-BSA (bovine serum albumin) at 1%. Thereafter, 300 µl of PBS-BSA at 1% are distributed into the wells and left for 4 h at room temperature. Finally, the plates are emptied and sealed in aluminum foil for a maximum of 8 days.

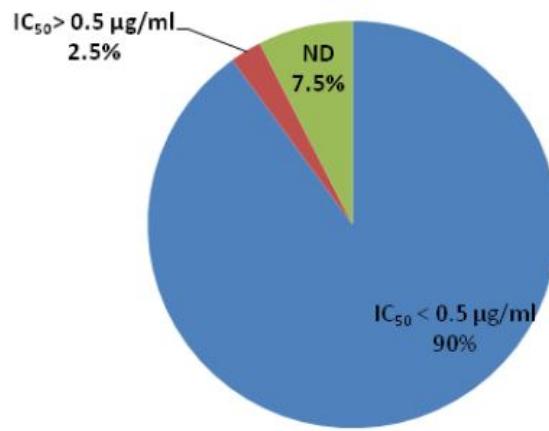


Figure 2. Representative curve of the different IC₅₀ highlighting the distribution of isolates. In total, 7.5% assays were unsuccessful while 2.5% of the isolates were resistant, and 90% sensitive to the TAA.

The DELI-Test

The 96-well plates are thawed and frozen 3 times to lyse the red blood cells. One deposits 100 µL of supernatant of culture in the plates with dimensions and saturated. After incubation at 37°C for 1 h, they are washed 3 times with PBS-BSA with 1% and supplemented with biotinylated anti-pLDH Mab 19G7 antibody. After 1 h of incubation at 37°C, the plates are washed 3 times with PBS-BSA then a streptavidin-peroxidase solution is added to the wells followed by incubation for 30 min at room temperature. They are washed 3 times with PBS-BSA 1%. Peroxidase substrate, 3,3', 5,5'-tétraméthylbenzidine and hydrogen peroxide to 0.02% are added to the mixture. The enzymatic reaction is stopped after 5 min per addition of 100 µL 1M phosphoric acid per well. The intensity of the yellow color obtained is measured at 450 nm using a spectrophotometer (StatFax-2100, Awareness Technology Inc). The test is interpretable when the optical density of the well without tea *A. annua* lies between 0.4 and 1.5. The interpretation of the results is based on the optical density which is proportional to the quantity of pLDH. The results of the tests are expressed in 50% inhibitory concentration (IC₅₀), which is the tea *A. annua* concentration inhibiting 50% of the parasite growth. The IC₅₀ are calculated starting from the curve dose/OD (optic density) by the software GraphPad PRISM 4.

RESULTS

Forty fresh samples collected from the study participants were tested and 37 *P. falciparum* isolates adapted to the *in vitro* growth. The cut-off value for resistance to TAA is 0.5 µg/ml. The geometric mean IC₅₀ was 0.095 µg/ml.

The IC₅₀ values were lower than 0.5 µg/ml for 36 samples and only one exhibited an IC₅₀ > 0.5 µg/ml. The IC₅₀ were undetermined for 3 isolates for unknown reasons. The 3D7 and W2 laboratory adapted strains exhibited IC₅₀ of 0.146 and 0.394 µg/mL, respectively (Figure 2). The *in vitro* susceptibility of those isolates was also determined for CQ. The cut-off value for CQ resistance was set at 100 nM (Le Bras et al., 1990). The prevalence of isolates which exhibited resistance to CQ is 18.9%. Linear regression shows quite a weak association between TAA and CQ (R-squared = 0.0034). The geometric mean TAA IC₅₀ in samples resistant and susceptible to CQ was 0.144 and 0.141 µg/ml, respectively (Table 2).

DISCUSSION

As the use of *A. annua* in Chinese population has been documented for many centuries against different ailments and malaria-like symptoms, we found it relevant to assess the *in vitro* antiplasmodial effect of TAA in *P. falciparum* strains. The known reference laboratory adapted strains 3D7 and W2 were tested in parallel as a control. The tea showed a strong antiplasmodial effect against the chloroquine sensitive 3D7 (0.14 µg/ml) and chloroquine resistant W2 (0.39 µg/ml) strains. The latter is considerably lower than the one obtained in Brazil, where a chloroquine resistant strain showed an IC₅₀ of 6.1 µg/ml (De Mesquita et al., 2007). This difference is likely due to many parameters as the origin of the leaves of *A. annua*. The Brasilian leaves were grown locally and the local environment in which the plants are cultivated is of importance in the concentration of different chemical groups that are present in the leaves. However, the mean IC₅₀ obtained in our study (0.095 µg/ml) is comparable to values obtained in Tanzania by Malebo and colleagues (Malebo et al., 2009) who showed a strong antiplasmodial activity of the tea *A. annua* with IC₅₀ less than 5 µg/ml. The Senegalese and Tanzanian TAA have a strong antiplasmodial activity, though they are not as rich in artemisinin as the one from Brazil. This suggests that the antiplasmodial activity of the tea is caused by not only the artemisinin, but the combined effect of other substances including coumarine, scopoletines, polyphenols, flavonoids, camphors and microelements. This hypothesis is supported by other studies from Europe, where *Artemisia absinthium* and *Artemisia abrotanum* have demonstrated antiplasmodial properties, though they do not contain artemisinin (Cubukcu et al., 1990; Deans and Kennedy, 2002). Additionally, Valécha showed anti-plasmodial activity in plants of the genus *Artemisia*, though they also do not contain artemisinin (Valecha et al., 1994).

A. Afra extracts are effective against *P. falciparum* *in vitro*, and this activity is attributable to a complex mixture of flavonoids and sesquiterpene lactones, rather than to a single compound (Kraft et al., 2003). Furthermore, the potential synergistic effects of artemisinin and flavonoids

Table 2. Correlation between parasite density and the IC_{50} . P represents the statistical significance of the test (p -value) whereas N represents the number of analyzed isolates.

		Parasite density (parasites / μ L)	IC_{50} (μ g/ml)
Parasite density (parasites / μ L)	Correlation coefficient	1	0.004
	p	-	0.981 > 0.05
	N	40	37
IC_{50} (μ g/ml)	Correlation coefficient	0.004	1
	p	0.981 > 0.05	-
	N	37	37

were described in 1987 (Elford et al., 1987). *A. annua* produces at least 36 flavonoids (Liu et al., 1992). Five of these have been shown selectively to potentiate the *in vitro* activity of artemisinin against *P. falciparum* (Liu et al., 1992). A study shows also that flavonoids present in TAA have shown a variety of biological activities and may synergize the effects of artemisinin against malaria (Ferreira et al., 2010). Coumarin, in addition to its role in the immune system and on schizonts, is also known as a metal chelator, notably of iron, a chief element of malaria and other infectious diseases (Yang et al., 1992). In Bolivia, a series of plants showed an IC_{50} of 9 μ g/ml for *Amburana osarensis* against *P. falciparum* isolates essentially due to the coumarin (Bravo, 2003). Curcumin, likewise, is an excellent iron chelator, in addition to its numerous therapeutic properties (Means, 2009).

In conclusion, tea *A. annua* has shown strong *in vitro* antiplasmodial activities in *P. falciparum* isolates collected in Pikine. Additional investigations including *A. annua* of different origins are needed to determine which plants have the best antimalarial effects. In addition, more investigations should be carried out to assess the cytotoxicity levels when TAA is used daily by local populations to avoid adverse events and if necessary set a reporting system of those adverse reactions.

REFERENCES

- Bravo JA, Sauvain M, Gimenez A, Massiots G, Deharo E, Lavand C (2003). A contribution to attenuation of health problems in Bolivia: Bioactive natural compounds from native plants reported in traditional medicine. *Revista Boliviana de Quimica* 20:11.
- Brisibe EA, Umoren E, Brisibe F, Magalhães PM, Ferreira JFS, Luthoria D, Wu X, Prior RL (2009). Nutritional characterisation and antioxidant capacity of different tissues of *Artemisia annua* L. *Food Chem.* 115: 1240-1246.
- Cubukcu B, Bray DH, Warhurst DC, Mericli AH, Ozhatay N, Sariyar G (1990). *In vitro* antimalarial activity of crude extracts and compounds from *Artemisia abrotanum* L. *Phytother. Res.* 40: 203-204.
- De Mesquita ML, Grelier P, Mambu L, De Paula JE, Espindola LS (2007). *In vitro* antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. *J. Ethnopharmacol.* 110: 165-170.
- Deans SG, Kenedy AI (2002). *Artemisia absinthium*. In *Artemisia*, Wright, C.W., Ed. Taylor and Francis, London. pp. 79-89.
- Dieye AM, Gueye I, Sy GY, Ndiaye-Sy A, Faye B (2008). Clinical trials in Dakar: survey on knowledge, attitudes and practices of key actors on the period from 2003 to 2007. *Thérapie*. 63(2): 89-96.
- Druilhe P, Moreno A, Blanc C (2001). A colorimetric *in vitro* drug sensitivity assay for *Plasmodium falciparum* based on a highly sensitive double-site lactate dehydrogenase antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 64: 233-241.
- Elford BC, Roberts MF, Phillipson JD, Wilson RJM (1987). Potentiation of the antimalarial activity of quinquaosu by methoxylated flavones. *Trans. R. Soc. Trop. Med.* 61: 434-436.
- Ferreira JFS, Janick J (1995). Floral morphology of *Artemisia annua* with special reference to trichomes. *Int. J. Plant Sci.* 156: 807-815.
- Ferreira JFS, Luthoria DL, Sasaki T, Heyerick A (2010). Flavonoids from *Artemisia annua* L. as Antioxidants and their potential Synergism with Artemisinin against Malaria and Cancer. *Molécules* 15: 3135-3170.
- Kraft C, Jennett-Siems K, Siems K (2003). *In vitro* antiplasmodial evaluation of medicinal plants from Zimbabwe. *Phytother. Res.* 17: 123-128.
- Le Bras J, Ringwald P (1990). *Plasmodium falciparum* chemoresistance. The situation in Africa in 1989. *Med. Trop.* 50: 11-16.
- Liu KC-3, Yang S-L, Roberts MF, Elford BC, Phillipson JD (1992). Antimalarial activity of *Artemisia annua* flavonoids from whole plants and cell culture. *Plant Cell Rep.* 11: 637-640.
- Malebo HM, Tanja W, Cal M, Swaleh SA, Omolo MO, Hassanal A, Sequin U, Hamburger M, Brun R, Ndiége IO (2009). Antiplasmodial, anti-trypanosomal, anti-leishmanial and cytotoxicity activity of selected Tanzanian medicinal plants. *Tanzan. J. Health Res.* 11(4): 226-234.
- Means RT (2009). Ironing out complementary medicine. *Am. Soc. Hematologie* 113: 270-271.
- Miller LH, Roberts T, Shahabuddin M, McCutchan TF (1993). Analysis of sequence diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP-1). *Mol. Biochem. Parasitol.* 59: 1-14.
- Moreno A, Brasseur P, Cuzin-Ouattara N, Blanc C, and Druilhe P (2001). Evaluation under field conditions of the colourimetric DELImicrotest for the assessment of *Plasmodium falciparum* drug resistance. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 95:100-3.
- Nkeh B, Chungag A, Njamen D, Dongmo A, Wandji J, Nguelefack TB, Wansi JD, Kamanyi A, and Forum ZT (2001). Antinflammatory and analgesic properties of the stem extracts of *Drypetes molunduana* Pax and Hoffm. (Euphorbiaceae) in rats. *Pharm. Pharm. Lett.* 11: 61-63.
- Noumi E, Yomi A (2001). Medicinal plants used for intestinal diseases in Mbalmayo region, Central Province, Cameroon. *Fitoterapia* 72(3): 246-254.
- Pages F, Texier G, Pradines B, Gadiaga L, Machault V, Jarjavali F, Penhoat K, Berger F, Trape JF, Rogier C, Sokhna C (2008). Malaria transmission in Dakar: a two-year survey *Malar J.* 7:178.
- Rath K, Taxis K, Walz G, Gleiter GH, Li SM, Heide L (2004). Pharmacokinetic study of artemisinin after oral intake of a traditional preparation of *Artemisia annua* L. (annual wormwood). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 70(2): 128-132.
- Sarr O, Myrick A, Daily J, Diop BM, Dieng T, Ndir O, Sow PS, Mboup S, Wirth DF (2005). *In vivo* and *in vitro* analysis of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* isolates from Senegal. *Parasitol. Res.* 97:136-40.
- Thomas MT, Ndir O, Dieng T, Mboup S, Wypij D, Maguire JH, Wirth.

- (2002). In vitro chloroquine susceptibility and PCR analysis of *Pfcrt* et *Pfmdr1* polymorphisms in *Plasmodium falciparum* isolated from Senegal. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66, 474-480.
- Tuffs A (2002). Three out of four Germans have used complementary or natural remedies. *BMJ* 325: 990.
- US Report (2002). Calls for tighter controls on complementary medicine. *Br. Med. J.* 324:870.
- Valecha N, Biswas S, Badoni V, Bhandari KS, Sati OP (1994). Antimalarial activity of *Artemisia japonica*, *Artemisia maritima* and *Artemisia nilegarica*. *Indian J. Pharmacol.* 26: 144-146.
- Verma S, Singh SP (2008). Current and future status of herbal medicines. *Vet. World* 1: 347-350.
- Wafo P, Nyasse B, Fontaine C, and Sondengam BL(1999). Aporphine alkaloids from *Enantia chlorantha*. *Fitoterapia* 70: 157-160.
- World Health Organization (WHO) (2006). National Policy on Traditional Medicine and Regulation of Herbal Medicine: Report of a WHO global survey.
- World Malaria Report, World Health Organization, 2010.
- Yang YZ, Ranz A, Pan HZ, Zhang ZN, Lin XB, Meshnick SR (1992). Daphnetin: a novel antimalarial agent with in vitro and in vivo activity. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46: 15-20.
- Zihiri GN, Mambu L, Guedé-Guina F, Bodo B, Grellier P (2005). In vitro antiplasmodial and cytotoxicity of 33 West African plants used for treatment of malaria. *J. Ethnopharmacol.* 98: 281-285.

Résumé et discussion de la publication 2: DAPI - test for evaluation *ex vivo* susceptibility on *Plasmodium falciparum* isolates collected in Thiès, Senegal to *Artemisia annua*

Gueye Papa Elhadji Omar, Dièye Baba, Diallo Mouhamadou, Mbaye Aminata, Bei Amy Kristine, Mboup Souleymane, Lutgen, Pierre, Wirth Dyann, Ndiaye Daouda

La situation du paludisme principalement en Afrique sub-saharienne peut être résumée par cette constatation décrite par l'Organisation Mondiale de la Santé, OMS (**OMS, 2002**). En effet, elle considère le paludisme comme le second contributeur au Disability Adjusted Life expectancy (DALY) en Afrique au sud du Sahara. Le paludisme constitue l'une des maladies parasitaires les plus importantes dans le monde. Il menace 40% de la population mondiale vivant dans quelques 90 pays. Les estimations font état de 219 millions d'épisodes palustres dans le monde dont 80% dans la région Africaine, soit 175 millions de cas (**OMS, 2012**). Le nombre des décès dû au paludisme est estimé à 660 000 personnes dont 90% en Afrique (**OMS, 2012**). Une grande majorité de ces décès surviennent chez les jeunes enfants en Afrique notamment dans les zones rurales reculées très mal desservies en service de santé. A l'échelle mondiale, 86% des victimes du paludisme sont des enfants de moins de cinq ans (**OMS, 2011**). Les études ont montrés que les enfants de moins de cinq ans et les femmes enceintes sont les groupes les plus vulnérables (**Abdullah et al, 2007 ; Brooker et al, 2007 ; Menendez et al, 2007**). Les femmes enceintes infectées sont souvent asymptomatiques mais la parasitémie peut causer des anémies maternelles et un poids de l'enfant faible à la naissance (**Dellicour et al, 2007**). Annuellement, 23 millions de grossesses sont menacées par la maladie et près de 200.000 nouveau-nés souffrent des conséquences de cette parasitose sur la grossesse. Les autres groupes à haut risque sont les voyageurs non immunisés, les réfugiés, les personnes déplacées et les ouvriers agricoles arrivant dans des zones d'endémie. Dans les pays d'endémie africains, le paludisme est à l'origine de 25 à 35% des consultations ambulatoires, de 20 à 45% des hospitalisations et de 15 à 35% des décès à l'hôpital, faisant ainsi peser une lourde charge sur les systèmes de santé.

Au Sénégal, le paludisme est endémique. Il représente 35% des motifs de consultation et constitue la première cause de morbidité et de mortalité (**Ministère de la Santé Publique, 2001**). Le taux de mortalité des enfants de moins de cinq ans est estimé à 121‰ (**Malaria Operational Plan, 2007**), et le pourcentage des décès d'enfants attribués au paludisme est de 28%. En 2004, la mortalité due au paludisme chez les femmes enceintes était estimée à près

de 13% (**Ministère de la Santé Publique, 2001**). Le taux de morbidité proportionnelle est passé de 35,72% des cas cliniques en 2001 à 3,07% des cas confirmés en 2009 (**PNLP, 2010**). Dans la même période, la mortalité proportionnelle est passée de 29,72% à 4,41% (**PNLP, 2010**). Malgré cette réduction, le paludisme demeure toujours un problème de santé publique au Sénégal.

Le paludisme freine le développement socio-économique (**Sachs et al, 2002**) en causant une baisse de la productivité des populations, des décès prématurés, des pertes financières liées aux coûts des traitements médicaux. Il entrave aussi la scolarité des enfants en augmentant le taux d'absentéisme scolaire. Il est considéré comme une maladie de la pauvreté mais aussi une cause de pauvreté. En effet, il existe une corrélation saisissante entre paludisme et pauvreté si l'on considère le niveau du revenu par tête d'habitant à travers le monde. Au Sénégal, on estime que près de 18% de perte du pouvoir d'achat est causé par le paludisme (**Sachs et al, 2002**).

La morbidité et la mortalité palustres persistantes sont dues à l'adaptation des parasites aux conditions de l'environnement, l'apparition de formes parasitaires multi résistantes et de moustiques résistants aux insecticides.

Parmi les mesures qui ont été mises en place pour éliminer ce parasite, on peut citer les stratégies anti vectorielles et les traitements qui consistent en l'utilisation de médicaments antipaludiques. Les traitements antipaludiques consistaient tout au début en l'utilisation de poudres de plantes médicinales. Ce mode de traitement persiste toujours à côté des molécules antipaludiques qui sont recommandées par l'OMS et le comité scientifique mondial.

Depuis quelques années, les plantes médicinales sont de plus en plus présentes dans la coopération en matière de politique de développement. Leur utilisation et leur préservation sont un thème transsectoriel englobant, outre les soins de santé, la protection de la nature et la biodiversité, ainsi que la promotion économique, le commerce et divers aspects juridiques (la propriété intellectuelle, par exemple). À l'heure actuelle, la majeure partie de la population mondiale dépend encore de la médecine traditionnelle et donc de l'utilisation de plantes et d'extraits végétaux. C'est tout particulièrement le cas des populations pauvres dans les pays en développement : en effet, les remèdes naturels sont non seulement meilleur marché que les médicaments modernes, mais ils sont souvent les seuls disponibles dans les régions reculées (selon l'OMS, 80 % de la population mondiale sont dépendants des plantes médicinales).

Importantes au plan médical et culturel, les plantes médicinales sont aussi un facteur économique majeur pour les pays en développement. La collecte de simples sauvages est souvent la seule source de revenu pour une certaine catégorie de population défavorisée au plan social et économique, comme les petits agriculteurs et les bergers sans terre. Plus de 1200 espèces végétales sont utilisées partout dans le monde pour traiter la malaria et plus de 75% des patients dans le monde ont choisi la médecine traditionnelle pour lutter contre le paludisme (**Willcox et al, 2004**). *L'A. annua*, employée avec succès depuis plus 2000 ans en Chine dans le traitement des fièvres en général et du paludisme en particulier, s'est révélée être une plante médicinale efficace. En plus de l'artémisinine, *l'A. annua* contient un grand nombre de substances

Ainsi notre travail évaluera la chimiosensibilité *ex vivo* des souches de *P. falciparum* par rapport à la tisane d'*A. annua*. Nous utiliserons le 4, 6-Diamine- 2-phenylindol dihydrochloride ou DAPI (confert méthodologie DAPI), pour procéder aux tests *ex vivo* qui consistent à identifier les différentes concentrations minimales inhibitrices où la moitié des parasites est éliminée IC₅₀ (**Baniecki et al. 2007**).

Les données ont été saisies sur Excel et les analyses statistiques ont été faites par le biais du logiciel STATA version 9 (Collège Station, TX, USA). Le résultat était considéré comme statistiquement significatif quand la valeur du test de probabilité P était inférieure à 0,05 (= 5%).

La population d'étude est composée de 45 patients dont 33 sont de sexe masculin et 12 de sexe féminin. Les âges varient entre 7 et 49 ans avec cependant une moyenne d'âge de 18,7 ans. La température et la parasitémie moyennes sont respectivement 38,7°C et 2,15%.

Les résultats obtenus ont montré une moyenne de CI₅₀ égale à 1,034 µg/ml. Cependant d'après Sauvin (2002) 41 échantillons (91,11%) ont des CI₅₀ inférieures à 5 µg/ml, un seul (2,22%) a une CI₅₀ supérieure à 5 µg/ml et trois (3) échantillons seulement ont donné des résultats ininterprétables correspondant à un pourcentage de 6,67% pour la tisane. Si on se réfère à Malebo et al, 2009, 15 échantillons (33,33%) ont des CI₅₀ \square 0,5 µg/ml, 25 échantillons (55,55%) ont des CI₅₀ comprises entre 0,5 µg/ml et 5 µg/ml et un seul (2,22%) a une CI₅₀ \square 5 µg/ml. Quelque soit l'auteur (**Sauvin et Malebo**), les résultats obtenus ont montré une bonne activité antipaludique de notre tisane d'*A. annua*. Concernant les souches de références que sont 3D7 et W₂, des CI₅₀ de 1,040µg/ml et 1,394µg/ml respectivement ont été observées, montrant ainsi la sensibilité de notre tisane.

La chimiorésistance fournit de nouveaux moyens pour décrire et caractériser le paludisme sur un site donné. Dans l'étude présentée ici, nous avons analysé la chimiosensibilité *ex vivo* des souches de *P. falciparum* par rapport à la tisane d'*A. annua* par la technique du DAPI-test. Cette technique peut être utilisée sur le terrain et constitue une alternative par rapport aux autres méthodes d'étude de la résistance qui utilisent soit la radioactivité ou des anticorps qui sont d'obtention difficile. Elle peut être d'une grande importance surtout dans les pays pauvres caractérisés par une limitation des ressources humaines et financières. En effet elle offre la possibilité de déterminer en une fois sur une même plaque les concentrations inhibitrices de différents médicaments.

Nous avons testé la chimiosensibilité *ex vivo* des souches de *P. falciparum* par rapport à la tisane d'*A. annua* en provenance de Luxembourg. Cette tisane est constituée de 0,2% d'artémisinine. La méthode d'extraction utilisée est celle décrite par **Rath et al, 2004** selon laquelle 70% de cette teneur en artémisinine seraient extraits après infusion.

Notre but était de voir si la tisane d'*A. annua* était efficace contre ces souches plasmodiales. Pour valider l'étude, nous avons effectué des tests sur les souches de références que sont 3D7 (chloroquinosensibles) et W2 (chloroquinorésistantes). Une forte activité antipaludique de la tisane, sur ces souches chloroquinosensibles et chloroquinorésistantes, a été observée avec des valeurs de 1,040 µg/ml et 1,394 µg/ml respectivement. Ces valeurs sont de loin inférieures à celles obtenues au Brésil où des CI₅₀ de **6,1µg/ml** ont été observées sur des souches chloroquinorésistantes (**De Mesquita et al., 2007**) et en Afrique du Sud avec des CI₅₀ de 2,6 µg/ml et 3,1 µg/ml (**Pillay et al, 2007**). Cependant ces valeurs sont supérieures à celles obtenues au Sénégal où des CI₅₀ de 0,146 µg/ml et 0,394 µg/ml ont été observées (**Gueye et al, 2013**) et en Afrique du Sud avec des CI₅₀ de 0,26 µg/ml (**Liu et al, 2010**).

Une recherche bibliographique en valeurs de référence pour notre CI₅₀ tel qu'exprimé à 1,034 µg/ml, nous montre une valeur fort acceptable. Des études menées en Tanzanie ont montré que les fortes activités antiplasmodiales de la tisane d'*A. annua* et autres plantes médicinales étaient observées pour des CI₅₀ inférieures à 5µg/ml (**Malebo et al, 2009**). Ramazani en 2010 avaient montré des activités antipaludiques signifiantes avec des CI₅₀ ≤ 50 µg/ml (**Ramazani et al, 2010**). Ceci permet de dire que notre tisane aurait une forte activité antiplasmodiale. Une étude faite au Comores sur 17 plantes montre une très bonne activité antipaludique *in vitro* avec des CI₅₀ = 2 µg/ml (**Kaou et al, 2008**). Par contre une étude qui a été faite par **Wright** a fourni des CI₅₀ de 0,21 ng/ml (**Wright et al, 2010**), de loin plus petite

que nos valeurs. Au Sénégal, Gueye avait montré de très fortes activités antipaludiques de la tisane d'*A. annua* avec des $CI_{50} = 0,095\mu\text{g}/\text{ml}$ (Gueye et al, 2013). Comparée à la majeur partie des études, notre tisane aurait une forte activité antipaludique même si le taux en artémisinine est faible comparée à d'autres tisane comme par exemple celle du Brésil. Ceci laisserait penser que cette forte activité antipaludique de la tisane luxembourgeoise serait due, non seulement à l'artémisinine seule, mais à l'effet combiné d'autres substances qui s'y trouvent (coumarine, scopolétines, phénols, flavonoïdes, camphres, microéléments, etc.). D'autres espèces d'*artémisia* contiennent en concentrations supérieures des coumarines de différentes formules, telles que la scopolétine ou la daphnetine. Les coumarines, à côté de leur rôle spécifique sur le système immunitaire et sur le plasmodium et les schizontes (Yang et al, 1992), sont également connues comme chélateurs de métaux, et notamment du fer, or le fer est un élément clef du paludisme et dans beaucoup d'autres maladies infectieuses. La curcumine, de même, à côté de ses nombreuses propriétés thérapeutiques est un excellent chélateur du fer. (Means, 2009).

Le rapport annuel de l'OMS de septembre 2008, dixit que seulement 3% des africains affligés de la malaria ont pu avoir recours aux ACT. Ils restent donc un médicament uniquement accessible à des couches privilégiées. Ainsi de nouveaux moyens de lutte plus accessibles et moins coûteux seraient un grand apport pour l'Afrique en général et le Sénégal en particulier. Cette étude serait une approche nouvelle des résultats probants. Les résultats obtenus pourront répondre aux besoins de la population sénégalaise dans la lutte contre la malaria. A l'aide de ces médicaments à base de tisane d'*artémisia*, un Etat africain peut ainsi constituer un frein contre la recrudescence de la maladie menaçante qu'est la malaria ; et ce, sans devoir faire face à l'augmentation régulière du coût des médicaments et sans avoir à solliciter l'aide régulière des bailleurs de fonds nationaux et internationaux.

Sur le plan économique, le Sénégal fait partie des pays les moins avancés avec près de 57,1% de la population générale vivant avec moins de 2 dollars US par jour (Ministère sénégalais de l'économie et des finances, 2003). L'intérêt économique de cette étude va consister à apporter des éléments de réponses dans la lutte contre la malaria dans les différentes localités du pays. Ceci du fait que la tisane d'*A. annua* pourrait être un produit accessible à toutes les catégories sociales par son coût peu élevé.

En perspectives, du fait que le paludisme constitue un problème de santé publique en Afrique subsaharienne, l'élargissement de ce projet pilote pourrait être une aubaine pour l'Afrique de lutter contre ce fléau désastreux. Des études ont montré que l'artémisinine

présente dans la tisane d'artémisia possède la vertu additionnelle pour renforcer le système immunitaire (**Willcox *et al.*, 2004**). Donc des études multidisciplinaires sur d'autres infections comme le VIH/SIDA et des maladies parasitaires s'avèrent importantes pour lutter contre ces fléaux qui menacent le monde.

Ce travail est soumis dans le journal Parasitology Research

Parasitology Research

DAPI - test for evaluation ex vivo susceptibility on Plasmodium falciparum isolates collected in Thiès, Senegal to Artemisia annua --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	DAPI - test for evaluation ex vivo susceptibility on Plasmodium falciparum isolates collected in Thiès, Senegal to Artemisia annua
Article Type:	Original Paper
Abstract:	<p>Abstract In Senegal, where malaria is endemic throughout the country, there is clear evidence that many people who need to be treated with this combination of anti-malarials do not have access to it. This situation results primarily from poverty. Therefore, it is necessary to define new strategies to alleviate the burden represented by the infection; it is also urgent to develop new ways and means to make it possible for all Senegalese citizens to afford to pay for the available treatment. One way to reach this goal is through the use of the herbal tea of Artemisia annua. We aimed at assessing by the Di Amidino Phenyl Indol (DAPI) test for the first time in Senegal, Plasmodium falciparum isolates ex vivo susceptibility to Tea Artemisia annua (TAA). Overall, 45 fresh samples collected from the study participants were tested and 42 P. falciparum isolates adapted to the ex vivo growth. The geometric average IC50 was 1.034 µg/ml. The IC50 values were lower than 5 µg/ml for 41 samples and only one exhibited an IC50 > 5 µg/ml. The IC50 value was lower than 0.5 µg/ml for 15 samples, 25 samples had IC50 ranging from 0.5µg/ml to 5µg/ml and only one sample had IC50 from 5µg/ml to 10µg/ml. The IC50 values were undetermined for 3 isolates for unknown reasons. The 3D7 and W2 laboratory adapted strains which respectively exhibited IC50 of 1.040 and 1.394 µg/ml. The results suggest that tea A. annua has a potent anti-plasmodial activity against P. falciparum strains collected in Thiès, Senegal.</p> <p>Keys words: Artemisia annua, Di Amidino Phenyl Indol (DAPI), Plasmodium falciparum, IC50</p> <p>Abstract In Senegal, where malaria is endemic throughout the country, there is clear evidence that many people who need to be treated with this combination of anti-malarials do not have access to it. This situation results primarily from poverty. Therefore, it is necessary to define new strategies to alleviate the burden represented by the infection; it is also urgent to develop new ways and means to make it possible for all Senegalese citizens to afford to pay for the available treatment. One way to reach this goal is through the use of the herbal tea of Artemisia annua. We aimed at assessing by the Di Amidino Phenyl Indol (DAPI) test for the first time in Senegal, Plasmodium falciparum isolates ex vivo susceptibility to Tea Artemisia annua (TAA). Overall, 45 fresh samples collected from the study participants were tested and 42 P. falciparum isolates adapted to the ex vivo growth. The geometric average IC50 was 1.034 µg/ml. The IC50 values were lower than 5 µg/ml for 41 samples and only one exhibited an IC50 > 5 µg/ml. The IC50 value was lower than 0.5 µg/ml for 15 samples, 25 samples had IC50 ranging from 0.5µg/ml to 5µg/ml and only one sample had IC50 from 5µg/ml to 10µg/ml. The IC50 values were undetermined for 3 isolates for unknown reasons. The 3D7 and W2 laboratory adapted strains which respectively exhibited IC50 of 1.040 and 1.394 µg/ml. The results suggest that tea A. annua has a potent anti-plasmodial activity against P. falciparum strains collected in Thiès, Senegal.</p> <p>Keys words: Artemisia annua, Di Amidino Phenyl Indol (DAPI), Plasmodium falciparum, IC50</p>
Corresponding Author:	Mouhamadou Diallo, Ph.D. Aristide Le Dantec Hospital, Cheikh Anta Diop University Dakar, SENEGAL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Aristide Le Dantec Hospital, Cheikh Anta Diop University
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Papa Elhadji Omar Gueye, PhD Student

Powered by Editorial Manager® and Production Manager® from Aries Systems Corporation

First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Papa Elhadji Omar Gueye, PhD Student Baba Dieye Mouhamadou Diallo, Ph.D. Aminata Mbaye Amy Kristine Bei, Ph D Souleymane Mboup, Professor Pierre Lutgen, Ph D Dyann F. Wirth, Professor Daouda Ndiaye, Professor
Order of Authors Secondary Information:	
Author Comments:	<p>Dear Editorial committee, The PhD thesis defense depends on the publication of this paper. Therefore we would be very grateful if you could expedite the observation of this manuscript. The deadline for the defense of this Thesis is the end of the year 2013 be 31 December 2013. Therefore we rely heavily on your understanding. We already publish in your in 2012. Best Regards!</p>
Suggested Reviewers:	<p>Dinparas Navid DJADIDT, Dr Researcher, Institut Pasteur of Iran navid@pasteur.ac.ir Dr Navid publish in this field.</p> <p>Antonella De Donno, Dr Researcher, University of Salento, Lecce, Italy antonella.dedonno@unisalento.it Dr Antonella De Donno publish in this field.</p>

*Manuscript

[Click here to download Manuscript: Manuscript.docx](#)

[Click here to view linked References](#)

INTRODUCTION

The World Health Organization considers malaria to be the second most important contributor to lost Disability-Adjusted Life Years (DALY) in Sub-Saharan Africa. There were an estimated 216 million malaria cases among the 3.3 billion people at risk in 2010, causing nearly 86% of deaths, mostly of children under 5 years (WHO 2011). Many of them have died for reasons such as being out of reach of health centers or because of the cost of malaria treatment. This situation renders urgent the need to find ways to mitigate this problem.

To accelerate the progress in malaria control, the 2005 World Health Assembly set targets of $\geq 80\%$ coverage for four key interventions: insecticide-dipped mosquito nets for people at risk; appropriate anti-malarial drugs for patients with probable or confirmed malaria; indoor residual spraying of insecticide for households at risk; and intermittent preventive treatment during pregnancy (Malaria World Report 2008).

In Senegal where malaria is endemic throughout the country, transmission occurs seasonally from June to November. Nearly 25% of all the deaths among less than 5-year old children are caused by the disease. In 2005, the Senegalese National Malaria Control Program adopted a combination of artesunate and amodiaquine as first-line treatment of *Plasmodium falciparum* malaria. In 2007, nearly 1 million courses of artemisinin-based combination therapies (ACT) were delivered, which represented 30% access to effective treatment (Malaria World Report 2008). Obviously, many people who need to be treated with this combination of antimalarials do not have access to it. This situation is mainly accounted for by poverty. It is estimated that the loss of 18% of the purchasing power in Senegal is caused by the disease. Therefore, it is necessary to define new strategies to alleviate the burden represented by the infection; it is also urgent to develop new means to make it possible for all Senegalese citizens to afford to pay for the available treatment.

One way to reach this goal is through the use of herbal tea of *Artemisia annua*. *Artemisia annua* as herbal tea has been used by the Chinese for millennia. Its effectiveness against malaria has also been described, and this tea could be a possible treatment for people exposed to the infection. Since its declaration of Alma ATA of 1978, the World Health Organization (WHO 1978) has encouraged the use of medicinal plants by poor countries. This policy was materialized by:

- the Ottawa Charter for Health Promotion (WHO/HPR/HEP/95.1)
- guidelines for the appropriate uses of herbal medicine, 1998 ISBN 9290611243
- WHO guidelines on Good Agricultural and Collection Practices (GACP) for medicinal plants, 2003
<http://whqlibdoc.who.int/publications/2003/9241546271.pdf>
- monograph of good practices for *Artemisia annua* in Agriculture WHO (GACP)
- WHO guidelines on safety monitoring of herbal medicine.

Moreover, as was shown in the studies conducted in the form of herbal tea, *A. annua* is very efficient against malaria. In fact, it acts 10 to 100 times more quickly than all the other drugs developed so far and intended for the treatment of malaria (Willcox et al. 2004).

Neither toxic effects nor habituation have been detected yet. Studies conducted in Ethiopia and Tanzania on infected patients has shown a treatment success rate between 80 and 100% (Ettling et al. 2006). In the same way, Mueller et al. showed that 7 days after the start of the treatment with the herbal tea of *A. annua*, 77% of the study patients did not have fever any longer. Fatigue had disappeared in 88% of the cases, and 92% of the patients no longer had muscle pains and nausea (Mueller et al. 2004).

In addition to its low cost (< \$0.30 US) compared to currently used ACT treatments (30 € for Coartem in Europe), the use of herbal tea could contribute to a greater accessibility for the populations especially in poor countries. Many Senegalese people suffering from malaria cannot afford ACTs. So, a more accessible and less

1 expensive means of malaria treatment would be a significant development for both Senegalese populations and
2 people suffering from malaria in other parts of the world. So far, no study aimed at testing the effectiveness of the
3 herbal tea of *A. annua* by DAPI-test has been carried out in Senegal. Recently, the plant was introduced in Senegal
4 and The Gambia and is grown in some areas where people have started to use it as herbal tea for malaria-like
5 symptoms.

6 In our study, we have decided to use 4,6-Diamine-2-phenylindol dihydrochloride (DAPI), a fluorescent
7 DNA stain, to carry out *ex vivo* susceptibility assays of the *Artemisia annua* herbal tea. The DAPI assay will make it
8 possible to determine the 50% inhibitory concentration (IC_{50}) of the herbal tea. IC_{50} values are a commonly used
9 measure of drug efficacy, in this case, for the herbal tea, indicating the point at which half the parasite growth is
10 inhibited by the treatment.
11
12

13 MATERIALS AND METHODS

14 Study site and population

15 The study samples were collected from malaria-infected patients attending a clinic for outpatients located in Thiès
16 (Figure 1) where malaria transmission is highly seasonal with an entomologic inoculation rate. Patients with
17 peripheral blood smears positive for *P. falciparum*, with non-complicated malaria, aged at least 5 years, were invited
18 to participate in the study as reported earlier (Thomas et al. 2002; Sarr et al. 2005). Those who had complicated
19 malaria, or were pregnant or had a recent history of antimalarial treatment were excluded.
20
21

22 Thiès area is located in the west of Senegal, 70 km from Dakar. About 13% of the national population live
23 in the region. The average temperature is 28.2°C with a maximum of 33.3°C in May and a minimum of 24.1°C in
24 January. The rainy season starts in June and ends in October. The annual average rainfall is 600mm.
25
26

27 Malaria is hyper endemic in this region with a recrudescence during the rainy season. Neuropaludism is especially
28 diagnosed among the youth. The prevalence of malaria is 26% with a morbidity of 39.9% and a mortality of 2.5%.
29 The transmission of malaria is caused by *Anopheles arabiensis*. The Entomologic inoculation rate is lower than 5
30 and the development of larvae is due to the presence of stagnant water, wells and puddles.
31
32

33 *Artemisia annua* dried leaves

34 Leaves of *A. annua* were graciously provided by Dr Pierre Lutgen and his colleagues from Iwerliewen Fir Bedreete
35 Volleker (IFBV), Luxembourg. They were dried in the shade in Luxembourg before being sent to Dakar in paper
36 bags weighing 20g. They were then kept at room temperature until they were tested.
37
38

39 Extraction methods

40 We have used the method described by Rath (Rath et al. 2004) which yields 70 to 76% of artemisinin. In a nutshell,
41 10g of dried leaves of *A. annua* were weighed and put in a glass container. Then 1 L of warm water was added and
42 the mixture was stirred for 10min and covered by a lid which is not of iron because the latter reacts easily with
43 artemisinin and may reduce the output of the extraction. The solution was then filtered to collect the tea *A. annua*.
44
45

46 Inclusion and exclusion criteria

47 The study population was composed of patients with uncomplicated *P. falciparum* malaria who agreed to participate
48 in the study. They have been selected from a clinic for outpatients located in Thiès.
49
50

51
52

53
54

55
56

57
58

59
60

61
62

63
64

65

1 Patients would be excluded if other malaria species were present in their blood, in the case of severe
2 malaria or if they have used another antimalarial during the previous two weeks. Pregnant women would be
3 excluded, too.
4

5 **Socio-demographic characteristics of the study population**

6 Overall, 45 patients were recruited, 33 of whom were males. The average age and parasite density were respectively
7 18.77 years (7 to 49) and 2.15%.
8

9 **Diagnosis and Consent procedure**

10 Thick and thin blood smears will be collected from the clinic patients showing symptoms which are consistent with
11 malaria. These smears will be stained with Giemsa and read by a well-trained microscopist and with Rapid
12 Diagnostic Test (RDT). Positive patients for *P. falciparum* malaria were invited to participate in the study as
13 previously reported (Thomas et al. 2002; Sarr et al. 2005).
14

15 **Blood collection**

16 After consent is obtained, a blood sample of 5 milliliters will be drawn in Ethylen Diamine Tetracetic Acid (EDTA)
17 Vacutainer tubes. The sample will be stored at 4°C and sent to the Molecular Biology laboratory at Le Dantec
18 Hospital in Dakar to perform the DAPI Assay.
19

20 **The DAPI-Assay**

21 The DAPI Assay uses the molecule 4', 6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI), which is a fluorescent dye belonging
22 to the Indol group (Figure 2). It is used to quantify the DNA in parasitized red blood cells.
23

24 **DAPI –Assay principle**

25 The DAPI molecules bind to the parasite DNA. In UV light, the DAPI emits blue fluorescence which can be
26 quantified and correlated to the quantity of parasite DNA present (Figure 3). This measure of parasite growth can
27 further be used to assess the *in vitro* sensitivity of *P. falciparum* isolates to different antimalarials.
28

29 **Protocol**

30 96-well plates are prepared and the wells contain variable concentrations of *A. annua*, 48 μ mol/l to 0,187 μ mol/l. The
31 different concentrations are obtained after serial dilution. Each well contains RPMI (culture medium) enriched with
32 serum. 180 μ l of parasitized red blood cells are added to specific wells using a multichannel pipette. The plates are
33 then incubated for 30 seconds at room temperature in culture bubbles, flushed with the ideal gas mixture for parasite
34 culture (N₂ 94%, 5% CO₂, and 1% O₂). After the gas is flushed, the bubbles are placed in an incubator at 37°C for
35 48 hours.
36

37 After 2 days, the plates are removed from the incubator and left to thaw out at room temperature. The plates
38 are spun for 4000 laps/min for 30 minutes, then the supernatant are removed. Then, in the dark, 100 μ l of DAPI is
39 added to the wells. The plates are covered with aluminium foil to protect the light-sensitive DAPI and are left to
40 incubate for 30 minutes at room temperature. The plates are then spun for 30 minutes at a rate of 4,000 rpm. The
41 DAPI solution is then aspirated and 200 μ l of PBS is added to each well. The plates are ready to be read in a
42 Fluoroskan Ascent Plate Reader (Baniecki et al. 2007). The interpretation of the results is done by a GraphPrism
43 update. Finally IC₅₀ values are obtained.
44

45 3
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6 **Statistical analysis**

7 Statistical analyses were performed using STATA 9 software (Stata Corporation, College Station, TX, USA). The
8 mean IC₅₀s was compared by t tests. Statistical associations were calculated using the Fisher's exact test and
9 statistical significance was set on an alpha level of 0.05.

10
11 **RESULTS**
12
13

14 **Samples**
15

16 On the whole, 45 samples of *P. falciparum* from 7 to 49 year-old patients have been selected for the evaluation of
17 *ex vivo* chimiosensitivity through the DAPI-Assay method.
18

19 **Differentiation of patients according to age and gender criteria**
20

21 Our sample population is composed of 45 patients, 35 of whom are male and constitute 77.77% and 10 of whom are
22 female, namely, 33.33%. The age range is 7 to 49, which leads to an average of 18.77 ages. Details are as follows:
23

- 24 - 6 patients are 0 to 9 years old (13.33%), 5 of whom are male (11.11%) and 1 female (2.22%)
25
- 26 - The 39 remaining patients (86.67%) are 10 to 49 years old, 30 of whom are male (66.67%) and 9 female
27 (20%). 10 to 49-year old patients are more representative in our study population sample (Table 1).
28

29 **Differentiation of patients according parasitemia and age criteria**
30

31 The parasitemia density is estimated in rate at values ranging from 0.1% to 4.91%. The average parasitemia is
32 2.15%. Details are as follows:
33

- 34 - 14 samples (31.11%) showed that parasitemia ranged from 0.1% to 0.4%, 2 (4.44%) from 0 to 9-year old
35 patients and 12 (26.67%) from 10 to 49-year old patients.
36
- 37 - 8 samples (17.78%) have parasitemia ranging from 0.5 to 0.9%, 2 (4.44%) from 0 to 9-year old patients
38 and 6 (13.34%) from 10 to 49-year old patients.
39
- 40 - 23 samples (51.11%) have parasitemia ranging from 1 to 4.96%, 2 (4.44%) come from 0 to 9-year old
41 patients and 21 (46.67%) come from 10 to 49-year old patients (Table 2).
42

43 **Differentiation of patients according parasitemia and gender criteria**
44

45 Gender details are as follows:
46

- 47 - 14 samples (31.1%), 13 males (28.87%) and 1 female (2.23%) have parasitemia ranging from 0.1 to 0.4%;
48
- 49 - 8 samples (17.79%) of our study population with 7 males (15.56%) and 1 female (2.23%) have
50 parasitemia ranging from 0.5 to 0.9%;
51
- 52 - 23 samples (51.11%), 15 males (33.33%) and 8 (17.78%) females have parasitemia ranging from 1 to
53 4.96% (Table 3).
54

55 **Global distribution of the IC₅₀**
56

57 Overall, 45 fresh samples collected from the study participants were tested and 42 *P. falciparum* isolates adapted to
58 the *ex vivo* growth. The IC₅₀ were undetermined for 3 isolates for unknown reasons. The 3D7 and W2 laboratory
59 adapted strains which respectively exhibited IC₅₀ of 1.040 and 1.394 µg/ml. The geometric average IC₅₀ was 1.034
60 µg/ml. Be it Sauvin or Malebo, our tea *A. annua* has proved to be efficient for the *P. falciparum* collected in Thiès,
61 Senegal.
62

10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Distribution of the IC_{50} according Sauvin 2002

Among the 45 *P. falciparum* isolates tested to tea *A. annua*:

- A very good antiplasmodial activity of Tea *A. annua* in 41 samples (91.11%) is noticed, corresponding to $IC_{50} < 5 \mu\text{g/ml}$.
- A good antiplasmodial activity of the Tea is noticed in only one sample (2. 22%) corresponding to $5 \mu\text{g/ml} \leq IC_{50} < 10 \mu\text{g/ml}$.
- However, no weak activity of the Tea *A. annua* on *falciparum* sample is detected (Table 4).

Distribution of the IC_{50} according Malebo et al. 2009

According to Malebo et al. 2009, the samples tested to Tea *A. annua* showed:

- A very strong antiplasmodial activity of Tea *A. annua* on 15 *falciparum* isolates (33.33%) corresponding to $IC_{50} < 0.5 \mu\text{g/ml}$.
- A moderate antiplasmodial activity of the tea was noticed on 25 isolates (55.55%) with IC_{50} ranging from $0.5 \mu\text{g/ml}$ to $5 \mu\text{g/ml}$.
- A light activity of the Tea was detected but only in one sample (2.22%).
- However, the tea was efficient in all *falciparum* samples (Table 5).

DISCUSSION

Chimioresistance provides new means to describe and characterize malaria in a given area. In this study, we have analyzed the *ex vivo* chimiosensitivity of *P. falciparum* isolates in relation to Tea *A. annua* according to the DAPI-assay. The DAPI Assay constitutes an important alternative to previous methods. The [^3H] hypoxanthine assay, for example, uses radioactive materials that cannot be disposed of in most laboratory settings. Other assays, such as antibody assays, are more complicated than DAPI, with more reagents and chances for contamination. The DAPI assay can be used in the field and is useful for high-throughput screening of many drugs on the same 96-well plate. This method could be of great importance, especially in poor countries characterized by a limitation of human and financial resources.

We have tested the *ex vivo* chimiosensitivity of *P. falciparum* sample according to Tea *A. annua* that we obtained from Luxemburg. This Tea consists of $0.2 \mu\text{g/ml}$ of artemisinin. The extract method that we have used in this work is that of Rath (Rath et al. 2004) according to which 70% of artemisinin has to be extracted after infusion.

Our aim was to see if the Tea *A. annua* would be efficient on *P. falciparum* samples. To validate this study, we have done tests on the referential samples 3D7 (Chloroquine-sensible) and the W2 (Chloroquine-resistant). Strong antimalarial effectiveness of the Tea *A. annua* has been observed on the 3D7 and W2, respectively with $1.040 \mu\text{g/ml}$ and $1.394 \mu\text{g/ml}$ values. This value is far inferior to those obtained in Brazil where IC_{50} , $6.1 \mu\text{g/ml}$ have been observed in chloroquine-resistant samples (De Mesquita et al, 2007) and in South Africa with IC_{50} of $2.6 \mu\text{g/ml}$. Indeed, that is why we state that the results in Senegal are far inferior where IC_{50} of $0.146 \mu\text{g/ml}$ and $0.394 \mu\text{g/ml}$ have been found (Gueye et al. 2013). Liu et al, have come up with IC_{50} of $0.26 \mu\text{g/ml}$ (Liu et al. 2010), a lower result than our study. This difference is probably due to many parameters such as the origin of the leaves of *A. annua*.

If we compare the referential values of our IC_{50} ($1.034 \mu\text{g/ml}$) to the ones obtained in our literature review, we find a rather acceptable value. Some studies conducted in Tanzania have shown that strong antimalarial activities of Tea *A. annua* and other medicinal plants were obtained for $IC_{50} < 5 \mu\text{g/ml}$ (Malebo et al. 2009). In 2010, Ramazani showed significant antimalarial activities with $IC_{50} \leq 50 \mu\text{g/ml}$ (Ramazani et al. 2010). These results lead

us to state that our Tea has a strong antimalarial activity. A study conducted in Comores on 17 plants has shown a good *in vitro* antimalarial activity with $IC_{50} = 2 \mu\text{g/ml}$ (Kaou et al. 2008).

However, Wright's IC_{50} (0.21 ng/ml) has proved to be far smaller than our values. As regards the studies conducted in Senegal, they have shown a very strong antimalarial activity of Tea *A. annua* with $IC_{50} = 0.095 \mu\text{g/ml}$ (Gueye et al. 2013). Compared to the major parts of the studies conducted in this field, our Tea *A. annua* has a strong antimalarial activity even though the artemisinin rate is low (if compared to that of Brazil). This leads to the conclusion that this strong antimalarial activity of the Luxemburgian Tea is not only due to the artemisinin but also to the combined effect of other substances such as coumarin, scopoletin, polyphenols, flavonoids, camphor, etc. This hypothesis is supported by other studies from Europe, where *A. absinthium* and *A. abrotanum* have demonstrated antiplasmodial properties, although they do not contain artemisinin (Cubukcu et al. 1990; Deans and Kennedy 2002). Additionally, Lui showed an anti-plasmodial activity in plants of the *Artemisia* family, although they do not contain artemisinin either (Lui et al. 2010). *A. Afra* extracts are effective against *P. falciparum* *in vitro*, and this activity is attributed to a complex mixture of flavonoids and sesquiterpene lactones, rather than to a single compound (Kraft et al. 2003). Furthermore, the potential synergistic effects of artemisinin and flavonoids were described in 1987 (Elford et al. 1987). *A. annua* produces at least 36 flavonoids. Five of these have been shown selectively to highlight the *in vitro* activity of artemisinin against *P. falciparum* (Liu et al. 1992). According to a study, flavonoids present in Tea *A. annua*, have shown a variety of biological activities and may synergize the effects of artemisinin against malaria (Ferreira et al. 2010). Coumarin, in addition to its role in the immune system and in schizonts, is also known as a metal chelator, notably of iron, a chief element of malaria and other infectious diseases (Yang et al. 1992). In Bolivia, a series of plants showed an IC_{50} of 9 $\mu\text{g/ml}$ for *Amburana osarensis* against *P. falciparum* isolates essentially due to the coumarin (Mueller et al. 2000). Likewise, Curcumin is an excellent iron chelator, in addition to having numerous therapeutic properties (Makler et al. 1993; Willcox et al. 2011).

According to the WHO annual report in September 2008, only 3% of the African population who suffered from malaria had access to ACT. This is obviously a medicine reserve for privileged people. So, new more accessible and less costly medicine would be a great relief for Africans in general and Senegalese people in particular. This study would be original and innovating in the sense that it would help Senegalese people to fight against malaria at a lower price. Therefore, in general, low-income countries have an effective treatment against malaria.

In the economic field, Senegal is ranked among the less developed countries with nearly 57.1% living under \$ 2 US per day (Ministère de l'Economie et des Finances, 2003). The economic benefit of this Tea would be worthwhile in remote areas of Senegal insofar as it will then make it possible to treat malaria without spending much money. In this context, *Artemisia a.* Tea has a real advantage compared to other products.

As future prospects, since malaria is a public health concern, extending the pilot project would possibly be a good solution in the fight against malaria in Sub-Saharan Africa.

Other studies have shown that artemisinin contained in the Tea *A. annua* has an additional virtue: it strengthens the immunity system (Willcox et al. 2004). As a result, multidisciplinary studies on HIV/AIDS and illnesses due to parasites would be of paramount importance to fight against these flaws which constitute a real threat to the world.

Acknowledgments A NIH Grant to Prof DF Wirth (1.2D43TW01503) and a fellowship from Iwerliewen Fir Bedreete Volleker to Mr. Papa Elhadji Omar Gueye funded the study. We are thankful to patients at the outpatient clinic in Thiès who voluntarily consented to participate in the study.

1 Ethical standards Thick and thin blood smears will be collected from patients presenting at the clinic with
2 symptoms consistent with malaria. These smears will be stained with Giemsa and read by a well-trained
3 microscopist and with Rapid Diagnostic Test (RDT). Positive patients for *P. falciparum* malaria will be invited to
4 participate in the study. A written consent form is translated into *wolof* (national language) for any patient or his
5 legal guardian in case he/she cannot read. The form is signed by the patient and the investigator. To keep
6 confidentiality of the participants, we have used a code. The study was approved by the National Ethics Committee
7 of the Ministry of Health and the Medical Prevention.

8
9
10 **Conflict of interest** The authors declare that they have no competing financial and personal interests that may
11 influence their work.

13
14 **REFERENCES**

- 16 Baniecki ML, Wirth DF, Clardy J (2007) High-throughput *Plasmodium falciparum* growth assay for malaria drug
17 discovery. *Antimicrob Agents Chemother*, 51, 716-23
18
19 Cubukcu B, Bray DH, Warhurst D C, Mericli AH, Ozhatay N, Sariyar G (1990) In vitro antimalarial activity of
20 crude extracts and compounds from *Artemisia abrotanum* L. *Phytother. Res.* 40: 203-204
21
22 Deans SG, Kenedy AI (2002) *Artemisia absinthium*. In Artemisia, Wright, CW, Ed.Taylor and Francis, London.
23 pp. 79-89
24
25 De Mesquita ML, Grellier P, Mambu L, De Paula JE, Espindola LS (2007) *In vitro* antiplasmodial activity of
26 Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. *J. Ethnopharmacol.*, 110, 165-170
27
28 Elford BC, Roberts MF, Phillipson JD, Wilson RJM (1987) Potentiation of the antimalarial activity of quinquaosu
29 by methoxylated flavones. *Trans. R. Soc. Trop. Med.* 61, 434-436
30
31 Ferreira JFS, Luthria DL, Sasaki T, Heyerick A (2010) Flavonoids from *Artemisia annua* L. as Antioxidants and
32 their potential Synergism with Artemisinin against Malaria and Cancer. *Molecules* 15: 3135-3170
33
34 Gueye, PEO, Diallo M, Deme AB, Badiane AS, Mare DD, Ahouidi A, Ndiaye AA, Dieng T, Lutgen P, Mboup S,
35 Sarr O (2013) Tea *Artemisia annua* inhibits *Plasmodium falciparum* isolates collected in Pikine, Senegal
36 ISSN 1996-0778 ©2012 Academic Journals / DOI: 10.5897 / AJBR 12.022 / Available online at
37 <http://www.academicjournals.org/AJBR African Journal of Biochemistry Research>, 7, 107-113
38
39 Kaou AM, Mahiou-Leddet V, Hutter S, Aïnouddine S, Hassani S, Yahaya I, Azas N, Ollivier E (2008) Antimalarial
40 activity of crude extracts from nine African medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 116, 74-83
41
42 Kraft C, Jennett-Siems K, Siems K (2003) *In vitro* antiplasmodial evaluation of medicinal plants from Zimbabwe.
43 *Phytother. Res.* 17: 123-128
44
45 Liu KC-S, Yang S-L, Roberts MF, Elford BC, Phillipson JD (1992) Antimalarial activity of *Artemisia annua*
46 flavonoids from whole plants and cell culture. *Plant Cell Rep.* 11: 637-640
47
48 Liu NQ, Cao M, Frédéric M, Choi YH, Verpoorte R, van der Kooy F. (2010) Metabolomic investigation of the
49 ethnopharmacological use of Artemisia afra with NMR spectroscopy and multivariate analysis. *J
50 Ethnopharmacol*; 128:230-35
51
52 Makler MT, Ries JM, Williams JA, et al. (1993) Parasite lactate dehydrogenase as an assay for *Plasmodium*
53 *falciparum* drug sensitivity. *Am J Trop Med Hyg*; 48:739-41
54
55 Malebo HM, Tanja W, Cal M, Swaleh SA, Omolo MO, Hassanali A, Sequin U, Hamburger M, Brun R, Ndiége IO
56 (2009) Antiplasmodial, anti-trypanosomal, anti-leishmanial and cytotoxicity activity of selected Tanzanian
57 medicinal plants. *Tanzan. J. Health Res.* 11, 226-234
58
59
60
61
62
63
64
65

- Ministère sénégalais de l'économie et des finances, (2003) PNUD, Indicateur du développement humain 2003
ONUSIDA, UNICEF
- 1 Mueller MS, Karhagomba IB, Hirt HM, Wemakor E (2000) The potential of *Artemisia annua L.* as a locally
2 produced remedy for malaria in the tropics: agricultural, chemical and clinical aspects. *J Ethnopharmacol*; 73:
3 487-93
4 Mueller MS, Runyambo N, Wagner I, Borrmann S, Dietz K, Heide L (2004) Randomized controlled trial of a
5 traditional preparation of *Artemisia annua L.* (Annual Wormwood) in the treatment of malaria. *Trans. R. Soc.
6 Trop. Med. Hyg.*, 98, 318-321
7 Organisation Mondiale de la Santé (OMS), (1978) Approche thématique, rubrique promotion de la santé.
8 Déclaration d'Alma-Ata
9 Organisation Mondiale de la Santé (2011) Résumé et points essentiels. World Malaria Report 2011
10 Pillay P, Robert V, Maharaj VJ, Smith PJ, Lategan CA (2007) Isolation and identification of antiplasmodial
11 sesquiterpene lactones from *Oncosiphon piluliferum*. *Journal of Ethnopharmacology*, 112, 71-76
12 Ramazani A, Zakeri S, Sardari S, Khodakarim N, Djadidt DN (2010) *In vitro* and *in vivo* antimalarial activity of
13 *Boerhavia elegans* and *Solanum surattense*. *Malaria J*, 9:124
14 Rath K, Taxis K, Walz G, Gleiter CH, Li SM, Heide L (2004) Pharmacokinetic study of artemisinin after oral
15 intake of a traditional preparation of *Artemisia annua L.* (annual wormwood). *American Journal of Tropical
16 Medicine and Hygiene*, 70, 128-132
17 Sarr O, Myrick A, Daily J, Diop B M, Dieng T, Ndir O, Sow PS, Mboup S, Wirth D F (2005) *In vivo* and *in vitro*
18 analysis of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* isolates from Senegal. *Parasitol. Res.* 97:136-40
19 Sauvin M (2002) From ethnopharmacology to laboratory results: does discrepancy mean irrelevancy? Elaboration of
20 pharmacopoeias, pp 172-176
21 Thomas MT, Ndir O, Dieng T, Mboup S, Wypij D, Maguire JH, Wirth DF (2002) *In vitro* chloroquine susceptibility
22 and PCR analysis of Pfcrt et Pfmdr1 polymorphisms in *Plasmodium falciparum* isolated from Senegal. *Am. J.
23 Trop. Med. Hyg.* 66, 474-480
24 Willcox M, Bodeker G, Bourdy G, et al. (2004) *Artemisia annua* as a traditional antimalarial medicine. In: Willcox
25 ML, Bodeker G, Rasoanaivo P, editors. *Traditional medicinal plants and malaria*. Boca Raton, FL: CRC Press;
26 p. 43-60
27 Willcox M, Benoit-Vical F, Fowler D, et al. (2011) Do ethnobotanical and laboratory data predict clinical safety and
28 efficacy of anti-malarial plants? *Malaria J*; 10(Suppl 1):S7
29 Wright CW, Linley PA, Brun R, Wittlin S, Hsu E (2010) Ancient Chinese Methods Are Remarkably Effective for the
30 Preparation of Artemisinin-Rich Extracts Qing Hao with Potent Antimalarial Activity. *Molecules*, 15, 804-812
31 Yang YZ, Ranz A, Pan HZ, Zhang ZN, Lin XB, Meshnick SR (1992) Daphnetin: a novel antimalarial agent with
32 *in vitro* and *in vivo* activity. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 46, 15-20
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Table

[Click here to download Table: Table 1.docx](#)

AGE (years)	GENDER				TOTAL			
	MALE		FEMALE					
	Number	%	Number	%				
0 ≤ A < 10	5	11.11	1	2.22	6	13.33		
10 ≤ A ≤ 49	30	66.67	9	20	39	86.67		
TOTAL	35	77.78	10	22.22	45	100		

Table 1: Differentiation of patients according to age and gender criteria

Table

[Click here to download Table: Table 2.docx](#)

PARASITEMIA (%)	AGE (years)				TOTAL	
	0 ≤ A < 10		10 ≤ A ≤ 49			
	Number	%	Number	%	Number	%
0,1 ≤ P < 0,5	2	4.44	12	26.67	14	31.11
0,5 ≤ P < 1	2	4.44	6	13.34	8	17.78
1 ≤ P ≤ 4,96	2	4.44	21	46.67	23	51.11
TOTAL	6	13.32	39	86.68	45	100

Table 2: Differentiation of patients according parasitemia and age criteria

Table

[Click here to download Table: Table 3.docx](#)

PARASITEMIA (%)	GENDER				TOTAL			
	MALE		FEMALE					
	Number	%	Number	%				
0,1 ≤ P < 0,5	13	28,87	1	2,23	14	31,1		
0,5 ≤ P < 1	7	15,56	1	2,23	8	17,79		
1 ≤ P ≤ 4,96	15	33,33	8	17,78	23	51,11		
TOTAL	35	77,76	10	22,24	45	100		

Table 3: Differentiation of patients according parasitemia and gender criteria

Table

[Click here to download Table: Table 4.docx](#)

IC ₅₀	Number of samples	Percentage (%)	Antimalarial activity
IC ₅₀ < 5µg/ml	41	91,11	Very good
5µg/ml ≤ IC ₅₀ < 10µg/ml	1	2,22	Good
IC ₅₀ ≥ 10µg/ml	0	0	Weak
ND	3	6,67	
Total	45	100	

Table 4: Distribution of the IC₅₀ according Sauvin, 2002

Table
[Click here to download Table: Table 5.docx](#)

IC ₅₀	Number of samples	Percentages (%)	Antimalarial activity
IC ₅₀ < 0,5µg/ml	15	33.33	Very strong activity
0,5µg/ml ≤ IC ₅₀ < 5µg/ml	25	55.55	Moderate activity
5µg/ml ≤ IC ₅₀ < 10µg/ml	1	2.22	Lightly activity
IC ₅₀ ≥ 10µg/ml	0	0	Inactivity
ND	3	8.90	
Total	45	100	

Table 5: Distribution of the IC₅₀ according Malebo and al, 2009

Figure
[Click here to download Figure: Figure 1.docx](#)



Figure 1: Map of Thies

Figure

[Click here to download Figure: Figure 2.docx](#)

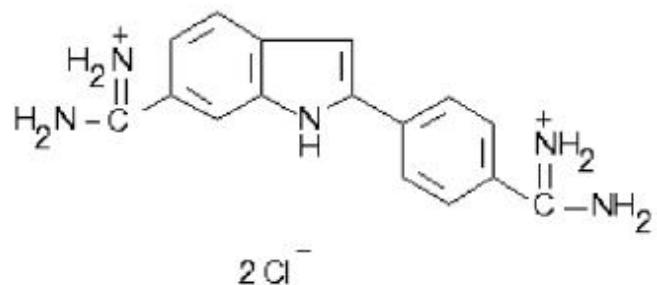


Figure 2: Chemical structure of 4', 6-Diamidino-2- Phenylindole (DAPI)

Figure

[Click here to download Figure: Figure 3.docx](#)

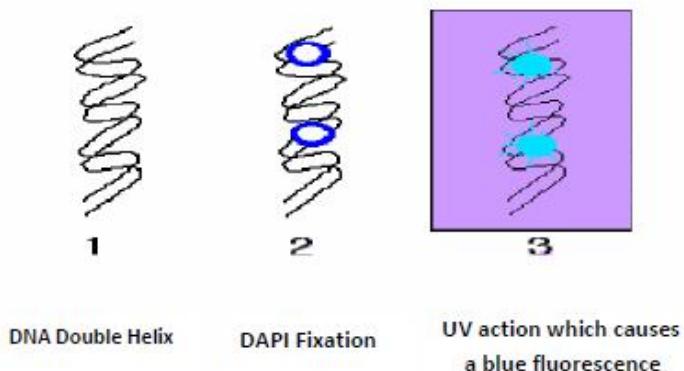


Figure 3: The dye is attached to the DNA fragment and then emits fluorescence on UV light

Résumé et discussion de la publication 3: Characterization of element and mineral content in *Artemisia annua* and *Camellia sinensis* leaves by handheld X-ray fluorescence

Traore Alassane, Diallo Mouhamadou, **Gueye Papa El Hadji Omar**, Wague Ahmadou, Lutgen Pierre, Sarr Ousmane, Mboup Souleymane

Les tisanes et les infusions sont traditionnellement utilisées par plusieurs peuples d'Afrique de l'Ouest dans le traitement du paludisme et d'autres infections. L'*A. annua* est originaire de la Chine, où elle est appelée qinghao (herbe verte) et y est utilisée plus de 2000 ans dans le traitement des symptômes associés avec la fièvre et le paludisme. En 1969, les chinois inscrivent leurs plantes médicinales dans la recherche. Une extraction à base d'éther diéthylique s'est avérée être efficace contre *Plasmodium sp*, et en 1972, le principe actif, l'artémisinine, a été isolé puis identifié par les chinois. L'artémisinine est promu comme étant un puissant antimalarial avec une faible toxicité.

Il ya au moins 6 variétés de thé, *C. sinensis*, (blanc, jaune, vert, oolong, noir et puerh). Mais les trois les plus populaires (vert, oolong et noir) se distinguent par leur degré de basicité de fermentation (**Powell et al, 1998**), mais seulement le thé vert a été pris en compte dans ce papier. Les feuilles de thé vert sont obtenues suite après séchage tandis que le thé noir est obtenu après un processus de fermentation. Pour s'assurer de l'effet bénéfique pour la santé humaine de l'*A. annua* et les différentes variétés de thé, il est important de connaître et d'évaluer les concentrations en éléments essentiels et non essentiels. Les éléments minéraux, fortement représentés dans les tisanes, jouent des rôles importants dans la physiologie humaine. Certaines substances sont indispensables alors que d'autres peuvent être accessoires. Par contre certaines substances minérales peuvent être toxiques. C'est le cas du plomb (Pb), le chrome (Cr), l'arsenic (As), le cadmium (Cd) ou Aluminium (Al). L'arsenic est fortement associé au cancer de la peau et peut causer d'autres cancers internes. La contribution de la tisane dans l'absorption minérale n'est pas certaine de même que la biodisponibilité de quelques éléments de la tisane n'est pas aussi connue (**Brisibe, 2006 ; Ferreira et al, 2006, Hayat et al, 2009**).

A. annua est une plante ubiquiste, annuelle et cultivée presque dans presque toutes les latitudes et peut atteindre 2 à 3 m de haut. C'est une plante qui contient beaucoup de composés bioactifs. Cependant le plus important est l'artémisinine. C'est un sesquiterpène lactone avec un pont peroxyde et est actuellement le composé le plus puissant et le plus

efficace contre les tropohozoites de *P. falciparum* (**Rajurkar et Damame, 1998 ; Shen et Chen, 2008**). Les infusions de thé vert (*C. sinensis*) sont valorisées par leur gout et leurs propriétés médicinales. Selon le Département de Statistique du Sénégal, l'importation annuelle des différentes variétés de thé vert originaire de Chine, est estimée à une valeur moyenne de 6 millions de dollars. Les feuilles de tisane contiennent pas moins de 350 composés, 40% de carbohydrate, 20% de protéines, 2% de lipides, 9% de minéraux (y compris le manganèse, le potassium, le magnésium, le fluor), beaucoup de vitamines B (B₁, B₂, B₃), vitamines C et vitamines D (**Problete, 1995**).

Les feuilles des 6 variétés de thé TEA 1 (« Flecha »), TEA 2 (« Cheval »), TEA 3 (« Thé la force »), TEA 4 (« Forte »), TEA 5 (« Sava ») et TEA 6 (« El Hella ») sont importées de Chine. Les thés 5 et 6 sont particulièrement commercialisés en Mauritanie. La caractérisation des macroéléments, des microéléments et des éléments très peu représentés dans les feuilles de *C. sinensis*, est d'une importance capitale pour comprendre l'efficacité pharmacologique de ces différents types de thés comparés à l'*A. annua*, plante utilisée dans le traitement de la malaria parmi d'autres infections comme les infections de la gorge, les diarrhées, les crampes intestinales, les pertes de poids etc (**Mueller et al, 2000**).

Le but de cette étude consiste à déterminer la composition des macros, microéléments et des éléments toxiques contenus dans les deux variétés d'*A. annua* (Luxembourg et Cameroun) et les variétés de *C. sinensis*.

La technique utilisée est le LIBS. Elle a permis d'évaluer le taux des éléments majeurs, mineurs et toxiques contenus dans les deux variétés d'*A. annua* TEA A (1% d'artémisinine) et TEA B (1,2% d'artémisinine) et des 6 variétés de thé de *C. sinensis* commercialisées au Sénégal. Le LIBS est une technique fiable, sensible et quantitative de plusieurs éléments et est appropriée à des analyses de routine (**Kitsa et al, 1992 ; Marques et al, 1993 ; Vincze et al, 1993, Calliari et al, 1995 ; Ostachowicz et al, 1995**).

Les échantillons sont séchés dans un four à 80°C jusqu'à l'obtention d'une masse constante. Les valeurs de Se, W, Ni et Co sont en dessous de la limite de détection. Les concentrations des éléments rares (Dy, Eu, Gd, Sm, Tb et Yb) ne sont pas détectées dans aucun thé. Les tableaux de valeurs montrent que les différents thés contiennent différents éléments en des valeurs non proportionnelles. Les macroéléments, qui assurent le maintien de l'équilibre de l'organisme, et obtenus après expérimentation sont K, Mg, Ca, P et S. La concentration en K est plus élevée au niveau du TEA B (*A. annua* du Cameroun) pendant que le Mg est seulement détecté au niveau du TEA B. La concentration en Ca est maximum dans le TEA 3

(Thé « la force »). La concentration en P est principalement plus importante au niveau du TEA A. Quant à S, il est détecté avec un maximum de concentration au niveau du TEA 6 (« El Hella »).

Les éléments tels que le Fe, Mn, Cu et Zn sont aussi détectés dans les différentes variétés de *C. sinensis* et d'*A. annua* à des concentrations variables. Ils sont considérés comme des éléments en trace (micronutriments) pour les organismes vivants et sont bien connus pour leur rôle contre les maladies parasitaires (**Wong et al, 1998 ; Zhou et al, 1996**). Mn entre dans la composition de plusieurs enzymes par exemple le manganèse glycosyl transférase et le phosphoenolpyruvate carboxykinase et est aussi essentiel pour la structure des arêtes des poissons. La même concentration en Zn a été observée dans les thés TEA 6, TEA 5 et TEA 3. Le Zn est un constituant essentiel de plus de 200 enzymes jouant des rôles catalytiques et structuraux. Un déficit en Zn se caractérise par des infections recurrentes, absence d'immunité et une mauvaise croissance. Le Zn peut avoir des effets positifs dans l'élimination des ulcères et dans la guérison des blessures. Après le Zn et le Fe, le Cu est le plus important élément en trace de l'organisme.

Le Cu est nécessaire dans l'oxydation du Fe^{2+} en Fe^{3+} pendant la formation de l'hémoglobine. Un déficit en Cu peut être un facteur de risque pour les maladies cardiovasculaires.

Le fer joue un rôle important dans le fonctionnement du système immunitaire et dans la production d'énergie. Chez l'enfant, un déficit en Fe peut être à l'origine d'anomalies telles que la réduction des performances cognitives, ralentissement de la croissance. Par contre chez l'adulte, le déficit en Fe peut provoquer des anémies.

Dans notre étude, un halogène important, le Chlore (Cl), a été détecté avec une importante concentration dans le TEA B. Ti est présent dans tous les échantillons avec un maximum de concentration au niveau du TEA 3. Ce métal, parmi tant d'autres, est employé comme une empreinte dans le diagnostic des tissus néoplasiques (**Fung et al, 2003**).

Dans le tableau 4, on a noté la présence d'éléments non essentiels comme Al, As, Sr, Rb et Pb avec des concentrations un peu considérables.

La concentration maximale d'Al a été trouvée dans le TEA B d'*A. annua* du Cameroun. As est détecté seulement dans le TEA B. Des concentrations élevées de Rb et de Sr ont été notées au niveau du TEA 3.

Au total, 35 éléments ont été déterminés par le LIBS dans les différents échantillons. Parmi ces éléments, on peut noter des éléments essentiels mais aussi quelques éléments

toxiques. Les différences d'éléments entre les échantillons peuvent être expliquées par la particularité d'absorption des plantes mais aussi par la composition des sols au niveau desquels ces plantes sont cultivées.

La présence d'éléments non essentiels et/ou toxiques a attiré notre attention et suscite une analyse approfondie pour comprendre les interactions possibles.

Ce travail est publié dans le journal African Journal of Biotechnology

Full Length Research Paper

Characterization of element and mineral content in *Artemisia annua* and *Camellia sinensis* leaves by handheld X-ray fluorescence

Traore Alassane¹, Diallo Mouhamadou^{1,2*}, Gueye Papa El Hadji Omar², Wague Ahmadou¹, Lutgen Pierre³, Sarr Ousmane² and Mboup Souleymane²

¹Institute for Applied Nuclear Technology, Cheikh Anta Diop University, Dakar, Senegal.

²Malaria Section, Molecular Biology Unit, Bacteriology and Virology Laboratory at Aristide Le Dantec Hospital, Cheikh Anta Diop University, Dakar, Senegal.

³Iwerliewen firbedreete Volleker (IFBV) Luxembourg NGO, Luxembourg.

Accepted 25 May, 2012

Tea infusion is the most frequently worldwide consumed beverage next to water, with about 20 billion cups consumed daily. *Artemisia annua* leaves contain comparable levels of nutrients and mineral elements (dry matter basis) to many marketed tea (*Camellia sinensis*) leading us to suspect that this crop could also serve as an alternative source of nutrients for humans. Analyzer moveable X-ray fluorescence is used to evaluate the content of major, minor and toxic elements in *A. annua* from two different countries compared to six marketed tea in Senegal. To ensure qualified results, certified reference materials were used to perform the calibration. The very low and often negligible levels of inherent elements in the leaves, which are far below recommended toxic levels, establishes *A. annua* and selected marketed tea as a good reservoir of elements that might favour its use as a potential herbal tonic by humans. The mineral elements are present in different kinds of herbal leaves in various proportions depending on soil composition and the climate in which the plant grows.

Key words: X-ray fluorescence (XRF), *Artemisia annua*, *Camellia sinensis*, elements, leaves, medicinal plant.

INTRODUCTION

Herbal teas and infusions are traditionally used by several people in West Africa for the treatment of malaria and protozoa infections. Although several phytochemical and pharmacological investigations have been done, *Artemisia annua* was incorporated to assess the efficacy for the treatment of malaria and other protozoa diseases taking into consideration the fact that it is an exotic plant

species growing in different soil and weather conditions (Malebo et al., 2009). *A. annua* (Asteraceae) is originated from China, where it is known as qinghao (green herb) and has been used for over 2,000 years to treat symptoms associated with fever and malaria. In 1969, the Chinese screened their medicinal plants in search of an effective antimalarial. A diethyl ether extract of *A. annua* was found to be effective against *Plasmodium* sp., and in 1972 the active ingredient, artemisinin, was isolated and identified by the Chinese. Among approximately 400 species of *Artemisia*, *A. annua* is the main source of artemisinin. Artemisinin has received considerable attention as a promising and powerful antimalarial drug for its stage specificity, its rather low toxicity, effectiveness against drug resistant *Plasmodium* species and activity against cerebral malaria (Ferreira et al., 1995; Shen et al., 2008).

*Corresponding author. E-mail: misbax@gmail.com or misbax@yahoo.co.uk. Tel: 221 33 822 5919 or 221 77 541 1957. Fax: 221 33 821 6442.

Abbreviations: XRF, X-ray fluorescence; ALP, alkaline phosphatase; *A. annua*, *Artemisia annua*; *C. sinensis*, *Camellia sinensis*.

There are at least six varieties of tea (*Camellia sinensis*): white, yellow, green, oolong, black and puerh. The three most popular types of tea (green, oolong and black) are distinguished on the basis of their degree of fermentation (Powell et al., 1998), but only the green tea was carried out in this paper. However as the standard, the leaves of green tea are dried and roasted whereas black tea is obtained after a fermentation process. Linking soil physico-chemical properties with their effects on biological systems require extensive sampling and a large number of elements to be analyzed coming from the soil to the plants uptake. Thus it is important to assess that the contents of essential and non essential elements, whether required by plants, are present sufficiently in plant-available concentrations, particularly in the tea leaves to ensure the numerous beneficial effects on health. However the presence of some potential toxic elements in tea leaves as lead (Pb), arsenic (As), chromium (Cr), cadmium (Cd) or aluminium (Al) constitutes a reason for concern. In the case of Cadmium we pay attention to the overlapping spectra between cadmium (Cd-L) and potassium (K) lines. For this purpose, the sandwich of molybdenum (Mo), Al and titanium (Ti) as filter was selected for Cd excitation and these additional filters with Ag was performed to improve the signal-to-noise ratio by reducing the measured continuum. On the other hand, Mo filter is the best choice, instead of silver direct excitation source alone, to attain larger signal-to-noise ratios.

Arsenic is strongly associated with human lung and skin cancer, and may cause other internal cancers as well. Skin lesions, peripheral neuropathy, and anaemia are consequences of chronic arsenic ingestion. Arsenic is the major risk factor for black food disease. The contribution of tea drinking to mineral absorption is not certain, as the bioavailability of many of these elements with tea is not known (Brisibe, 2006; Ferreira et al., 2006; Hayat et al., 2009). *A. annua* is a vigorous growing annual weedy herb, usually single-stemmed, reaching up to 2 to 3 m in height. The plant produces a beautiful portfolio of bioactive compounds. Thus far, the most important of the sesquiterpenoids seems to be artemisinin. Artemisinin is a cadinane-type sesquiterpene lactone with an endoperoxide bridge which is presently the most potent and efficacious compound against the late-stage ring parasites and trophozoites of *Plasmodium falciparum* (Rajurkar et al., 1998; Shen, 2008). For millennia in Asia, the infusions of green tea (*C. sinensis*) are valued for their taste and medicinal properties. Green tea is not fermented, but used almost in its natural state. The leaves are dried immediately to fresh air immediately after harvest. Some varieties are roasted. This preparation allows leaves to retain their color, but also the valuable substances that make the tea more than a drink: it has many medicinal properties.

The tea leaf contains not less than 350 components, 40% carbohydrate, 20% protein, 2% fat, 9% minerals

(including Manganese, Potassium, Magnesium, Fluor, many B vitamins (B1, B2, B3), vitamin C (in green tea), and vitamin D to promote the elasticity of blood vessels (Poblete, 1995).

The six types of *C. sinensis* leaves are imported from China. The TEA 5 and 6 are marketed particularly in Mauritania in Northern Senegal. The data of macro, micro and trace elemental content in tea (*C. sinensis*) leaves is of vital importance to understand the pharmacological actions of these kinds of tea compared to *A. annua*; a medicinal plants, which are also tea, consuming for the treatment of malaria among others as throat infections, diarrhea, intestinal cramps, weight loss, etc (Mueller et al., 2000). It is also interesting to note that comparison of the elemental contents of these six *C. sinensis* marketed to TEA A (0.1% of artemisinin content) and TEA B (1.2% of artemisinin content) shows the difficulty to assess elemental composition in medicinal plant and green tea depending on the soil and the climatic conditions of the growing area.

This study used an analyzer portable X-ray fluorescence for the evaluation of the major, minor and toxic elements in two different kinds of *A. annua* from Cameroun and Luxembourg and in six *C. sinensis* marketed in Senegal, western Africa. According to the Department of Statistics Senegal annually imports different varieties of green tea from china an average for a \$ 6 million (2008). The Energy Dispersive X-ray Fluorescence is a simultaneous, reliable, sensitive, quantitative multi-elemental and non-destructive technique, suitable for routine analysis because of minimal sample preparation (Kitsa et al., 1992; Marques et al., 1993; Vincze et al., 1993, Calliari et al., 1995; Ostachowicz et al., 1995). The elements are found to be present in the different kinds of *C. sinensis* in various proportions depending on soil composition and climate in which the plant grows.

The purposes of this study were: to analyze the macro, micro and potential toxic elements composition of these two kinds of *A. annua* from Luxembourg and Cameroon, and others selected *C. sinensis* marketed in Senegal.

MATERIALS AND METHODS

Samples were dried-out in an oven at 80°C until constant mass was obtained. To be ready for EDXRF analysis, the tea was ground to 120 µm using an agate mortar. But for homogenization a vibrating Planetary mill ("Pulverisette 5"), and to exclude any grain size effect in the analysis quantitative, was used to reduce grain size < 70 µm. The samples were prepared as a mixture of tea and Ethylene bis-Stearamide (known as Licowax or Hoechtwax HWC) used as binder agent, in a proportion of 1 g of tea sample to 10% of HWC of the mass of the sample. The mixture was thoroughly homogenized once more in a planetary mill and pressed (under 5 tones) into a disc pellet of 32 mm diameter. The pellets were measured using an EDXRF portable analyzer spectrometer (Niton XL3t900s Gold Air) with a 50 KV and 40 µA operating spectrometer with Au-anode excitation source and several filters as secondary targets for excitation.

This configuration allows the attainment of improved sensitivity and signal to noise ratio by sequentially selecting appropriate

Table 1. *Artemisia a.* and *Camellia s.* leaves samples selected in this study and their provenance.

Sample	Plant species	Label	Provenance	Commercial area
TEA A	Artemisia annua	Artemisia an	Luxembourg	Luxembourg
TEA B	Artemisia annua	Artemisia an	Cameroon	Cameroon
TEA 1	Camellia sinensis	Flecha	China	Senegal
TEA 2	Camellia sinensis	Cheval	China	Senegal
TEA 3	Camellia sinensis	Thé la force	China	Senegal
TEA 4	Camellia sinensis	Forte	China	Senegal
TEA 5	Camellia sinensis	The Sava	China	Mauritania
TEA 6	Camellia sinensis	El Hella	China	Mauritania

Table 2a. Spectrometer specifications and operating conditions.

Spectrometer specification	Operating condition
Resolution	162.15 eV (910 cps Mn Ka)
Window Thickness	12.7 μ m Be
Rating	50KV, 40 μ A maximum power of the tube 2 W
Diameter of the beam	7 mm
Filters	List of Element interest
Ag excitation source	Sb, Sn, Cd, Pd, Ag, Mo, Nb, Zr, Sr, Rh, Bi, As, Se, Au, Pb, W, Zn, Cu, Re, Ta, Hf, Ni, Co, Fe, Mn, Cr, V, Ti
Sandwich of	
Al, Ti and Mo	Ba, Sb, Sn, Cd, Pd, Ag
Cu	Cr, V, Ti, Ca, K
No filter	Al, P, Si, Cl, S, Mg

combinations of filters as secondary targets and different groups of elements were carried out depending on element of interest. These pellets were (three replicate measurements for each tea sample were performed) placed within the stand lid system. The use of portable analyzer for excitation and the characteristic X-rays emitted by the constituents of the samples were carried out for a period of 200 s. The XRF spectra deconvolution and the quantification were performed using Niton Data Transfer software (NDT) with internal algorithm.

The precision of the method was verified by using three different replicate samples due to the fact that measurements have been made in reproducible conditions. Table 2b shows the results of precision attained after the analysis of the NIST 2780.

The accuracy of the instrument was verified by analyzing five different materials: CCRMP TILL-4 180 to 601, NIST 2780 180 to 625, SiO₂ 99.995% 180 to 472, RCRA 180 to 436, NIST 2709a 180 to 469a. For the detection of present elements, X-ray fluorescence has been performed to evaluate environmental contamination of tea leave and medicinal plants and the verification of the bio-accumulation potential. In this study enhancement effects and/or absorption of characteristic X-ray emitted by the sample constituents make the quantification of the detected elements difficult. On the other hand, the use on thin sample for analyze was carried out by assessing the proportion between area density and attenuation factor and assuming monochromatic excitation source (Karimi et al., 2008; Markowick et al., 1993; Salvador et al., 2002; Matsumoto et al., 1976).

RESULTS AND DISCUSSION

The average values for each element were calculated only

for those elements for which results had very high concentrations of interest. The values of Se, W, Ni and Co are below the detection limit. The cases presenting missing or wrong values are excluded. The list of determined element includes macro, micro, toxic and trace elements (Cu, Zn, P, Si, Fe, S, Ti, Mn, Mg, As, Pb, Sr, Rb, Al and Cl) in six *C. sinensis* marketed leaves coupled with two kinds of *A. annua* plants. The concentrations of rare earth elements (Dy, Eu, Gd, Sm, Tb and Yb) were not detected in any tea leaves samples. The whole data from Tables 3 to 5 show that the different kinds of tea contain the elements in various and no proportional value. The arithmetical mean and standard deviation were carried out for elements which stand for a concern. Tables 1 to 3 show the concentrations of elements K, Mg, Ca, P and S considered as essential in the maintenance of equilibrium in the organism. Along these macro elements, the concentration of K is higher in TEA B of *A. annua*, Cameroon; while only in THE B is detected the presence of Mg. The concentration of Ca is maximum in TEA 3, "Thé la force", Senegal. P is mainly present in TEA A of *A. annua*, Luxembourg. S is detected with a maximum concentration in TEA 6, "El Hella", and Mauritania (Figure 1). Fe, Mn, Cu and Zn were also detected in the different varieties of *C. sinensis* and *A. annua* at varied concentrations. The elements Fe, Mn, Cu and Zn are essential trace elements (micronutrients) for living

Table 2b. Result of average value and certified value NIST 2780 ($\mu\text{g}/\text{kg}$).

Element	Certified value \pm Unc	\bar{X}	σ_x	$(\frac{\sigma_x}{\bar{X}})^*100$
Al	88700 \pm 3300	46007.23	790.64	1.7
Cd	12.1 \pm 0.24	11.98	3.18	26.5
Pb	5770 \pm 410	5136.42	69.84	1.3
As	48.8 \pm 3.3	80.06	10.03	12.5
Fe	27840 \pm 800	27235.71	263.07	0.9
K	33800 \pm 2600	34545.16	3096.47	8.9
Ca	1950 \pm 200	2052.61	45.92	2.2
P	427 \pm 40	3034.37	136.19	4.4
Mn	462 \pm 21	449.38	21.12	4.7
S	12630 \pm 420	9877.18	203.46	2.1
Sr	217 \pm 18	219.85	2.82	1.3
Rb	175	182.49	0.30	0.2
Cu	215.5 \pm 7.8	337.63	1.3	0.4
Zn	2570 \pm 160	2069.4	13.92	0.7
Mg	5330 \pm 200	N.D.	-	-

\bar{X} is the average value for three replicate measurements, σ_x the standard deviation, $(\frac{\sigma_x}{\bar{X}})^*100$ the relative standard deviation.

N.D. (Not Detected) due to the limit of detection for Mg (L.O.D = 9864.39 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)).

Table 3. Concentration ($\mu\text{g}/\text{kg}$) of essential macroelements in the studied tea leaves samples.

Sample	K	Mg	Ca	P	S
TEA A	219770 \pm 1640	<88140	93540 \pm 1040	18970 \pm 530	24820 \pm 430
TEA B	298740 \pm 2110	89690 \pm 43680	64850 \pm 890	15180 \pm 450	21910 \pm 380
TEA 1	134040 \pm 1160	< 65250	35480 \pm 490	14360 \pm 490	25940 \pm 450
TEA 2	119270 \pm 1030	< 70010	90710 \pm 890	11880 \pm 460	19950 \pm 390
TEA 3	116970 \pm 990	< 73970	121480 \pm 1110	13520 \pm 460	26110 \pm 420
TEA 4	141540 \pm 1240	< 80010	87340 \pm 950	15610 \pm 530	25180 \pm 460
TEA 5	147450 \pm 1250	< 69050	45220 \pm 580	15490 \pm 510	25890 \pm 450
TEA 6	163410 \pm 1430	< 79960	50550 \pm 670	14780 \pm 540	27060 \pm 490
Mean value	167648.7	77010	734646.2	14973.7	24607.5
Standard deviation	62161	31710	29369.6	2027.8	2421
Min. value	117000	-	45220	11880	19950
Max. value	298740	-	121480	18970	27060

organisms and well known for their role against parasitic diseases (Wong et al., 1998; Zhou et al., 1996). Mn is a component of several enzymes including manganese-specific glycosyl transferase and phosphoenolpyruvate carboxykinase and essential for normal bone structure. Mn deficiency can manifest as transient dermatitis, hypercholesterolemia and increased ALP level.

The concentration of Zn in TEA 6, TEA 5 and TEA 3 is the same, as well as it is not possible to assess the source plantation was the same in these three cases. Zinc is an essential component of over 200 enzymes having catalytic and structural roles. Zn deficiency is

characterized by recurrent infections, lack of immunity and poor growth. Low intake of zinc may cause coronary artery disease. Clinical materials prove that Zn can have good effect on eliminating ulcer and promoting healing wounds. Following zinc and iron, copper is the third most abundant trace element in the body. Copper is involved in the oxidation of Fe^{2+} to Fe^{3+} during hemoglobin formation. It is an important catalyst for iron absorption. Copper deficiency may be a risk factor for cardiovascular disease. When overt copper deficiency occurs, symptoms include Neutrogena, cardiac disorders, osteoporosis and anemia. Iron is needed for a healthy immune system and for

Table 4. Concentration ($\mu\text{g/kg}_{\text{dry}}$) of essential micro and trace elements in the tea leaves samples.

Sample	Fe	Mn	Cu	Zn
TEA A	6280 \pm 190	1410 \pm 100	250 \pm 30	270 \pm 20
TEA B	12200 \pm 260	1780 \pm 110	100 \pm 20	280 \pm 20
TEA 1	1730 \pm 110	7300 \pm 220	160 \pm 20	130 \pm 20
TEA 2	4520 \pm 160	9660 \pm 260	180 \pm 30	140 \pm 20
TEA 3	4340 \pm 170	8700 \pm 260	170 \pm 30	150 \pm 20
TEA 4	2950 \pm 160	11940 \pm 320	180 \pm 30	140 \pm 20
TEA 5	1600 \pm 110	9060 \pm 250	190 \pm 30	150 \pm 20
TEA 6	1870 \pm 130	10170 \pm 290	180 \pm 30	150 \pm 20
Mean value	4436.2	7502.5	176.2	176.2
Standard deviation	3542	3877.2	41	61
Min. value	1600	1410	100	130
Max. value	12200	11940	250	

Table 5. Concentration ($\mu\text{g/kg}_{\text{dry}}$) of non essential or toxic elements in the tea leaves samples.

Sample	Al	As	Pb	Rb	Sr	Cd
TEA A	12830 \pm 5780	<20	50 \pm 10	50 \pm 10	20 \pm 10	<20
TEA B	23400 \pm 6660	30 \pm 10	100 \pm 10	100 \pm 10	60 \pm 10	<20
TEA 1	<8040	<20	<20	100 \pm 10	30 \pm 10	<20
TEA 2	10830 \pm 4370	<20	<20	130 \pm 10	40 \pm 10	<20
TEA 3	18470 \pm 5390	<20	<20	190 \pm 10	90 \pm 10	<20
TEA 4	10920 \pm 5010	<20	<20	150 \pm 10	40 \pm 10	<20
TEA 5	8950 \pm 4350	<20	<20	130 \pm 10	40 \pm 10	<20
TEA 6	<8040	<20	<20	160 \pm 10	40 \pm 10	<20
Mean value	14233.33	21.45	75	126.25	45	-
Standard deviation	5557	10.6	37.2	43.1	21.4	-
Min. value	<8040	<20	<20	100	20	-
Max. value	23400	30	100	190	90	-

The concentration of Rb and Sr exhibits the highest value in TEA 3.



Figure 1. Pellet of tea leaves sample.

energy production. In young children, iron deficiency can manifest in behavioral abnormalities (including reduced attention) reduced cognitive performance and slow growth. In adults, severe iron deficiency anemia impairs physical work capacity.

We found one essential element as halogen Cl at higher concentration in *TEA B*. Ti is present in all analyzed tea samples with a maximum concentration in *TEA 3*. This metal, among others, is employed as fingerprints in the diagnosis of neoplastic tissues (Fung et al., 2003). It tends to form complexes in colon carcinoma with biological molecules such as nucleic acids and proteins. In Table 4, we drew attention for the presence of non-essentials elements, as Al, As, Sr, Rb and Pb in some considerable concentration. The maximum concentration of Al is found in *TEA B* of *A. annua* from Cameroon; while As is only present in *TEA B*. The presence of traces of Pb was detected (Foy et al., 1984; Coriat, Gillard, 1986; Koch, 1990; Delhaize, Ryan, 1995; Kochian, 1995; Kidd and Proctor, 2000).

Aluminum toxicity is a major factor limiting crop performance on acid soils that predominate under tropical climate. The primary toxicity symptom observed in plants is inhibition of root growth (Ruan, Wong, 2001; Rao, 1994), followed by less nutrient and water absorption, resulting in poor growth and production. Al interferes with the uptake, transport and utilization of essential nutrients including Ca, Mg, K, P, Cu, Fe, Mn and Zn (Shankar, Prasad, 1998; Black, 2003; Brown et al., 2002; Kordas, Stoltzfus, 2004).

Pollutants may also show high special variability depending on the pattern of emission sources and processes of transportation prevailing in the atmosphere and in deposition. The concentration of Rb and Sr shows the highest value in *TEA 3*. Lead is physiologic and neurological toxin that can affect several organs and organ systems in the human body. It also reduces cognitive development and intellectual performance in children and damage kidneys and the reproductive system (Rajurkar et al., 1998). The present results have to be in compliance with the World Health Organization permissible limits of Cd, As and Pb (Baqui et al., 2003; Chen et al., 2009; Zimmermann et al., 2010).

The high concentrations of Cd, As and Pb, generally in some medicinal plant, shows that the environment in concern is not free of pollution: the nature of soil and immediate surroundings. These chemical constituents present in herbal leaves in general are responsible for their medicinal as well as toxic properties which include vegetables bases comprising alkaloids and amines. For this point of view the consumers of these kinds of herbal leaves have to be careful of possible reason of serious health alterations (Sheded et al., 2006; Koe, Sari, 2009; Ashraf and Mian, 2008; Gjorgieva et al., 2011).

Many studies have concluded that *C. sinensis* has numerous beneficial effects on health, including the prevention of many diseases such as skin cancer, Parkinson's

disease, myocardial infarction, and coronary artery disease (Ajasa et al., 2004; Maiga et al., 2005). The difference in element of concentrations may therefore be attributed to *C. sinensis* leave products being produced in different fields with varying element of concentrations in the soils resulting in variation in plants elemental uptake. Moreover, differences in methods used in processing and storage could be contributory factors for this difference. Somewhere different results using different techniques and methods such as atomic absorption spectroscopy (AAS), inductively coupled plasma mass spectroscopy (ICP-MS), energy dispersive polarized X-ray fluorescence (EDPXRF) and inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES) are reported (Powell et al., 1998; Brisibe, 2006; Shen et al., 2008; Zimmermann et al., 2010; Chen et al., 2009; Sheded et al., 2006; Koe, Sari, 2009; Ashraf et al., 2008; Ajasa et al., 2004; Maiga et al., 2005).

Conclusion

Medicinal plants contain essential and trace elements, which can be available to the human body on consumption of herbs. Indeed today many, if not most, classes of drugs include a natural product prototype. The search for active chemicals from plant sources has continued and many compounds have been isolated and introduced into clinical medicine. Modern medicine is now beginning to accept the use of standardized plant extracts. Present study was also conducted to enhance the same knowledge further and is focused to investigate chemical composition including estimation of nutritional value, trace elements and potential toxic elements of *A. annua* and *C. sinensis* (Basgel, Erdemoglu, 2006; Jabeen et al., 2010; Djama et al., 2011).

A total of 35 elements have been determined by analyzer portable X-ray fluorescence spectrometer in two types of *A. annua* and six *C. sinensis* marketed in Senegal. X-ray fluorescence has been applied to the analysis of essential mineral element composition of tea leaves. But the presence of some toxic elements due to fertilizers or soil composition which grow plants that hamper the usefulness of the most and trace elemental content in tea leaves consumed beverage infusion next to water. The differences in the concentration of the various elements within the different tea (Table 5) is attributed to the preferential absorbability of a particular plant for the corresponding element and the mineral composition of the soil in which the plant grows as well as its surrounding climatologically conditions.

We have to draw attention on the presence of non essentials and/or potential toxics elements. However, as tea is an indispensable part of everyday life for many people in Senegal, studies should never be stopped or neglected to ensure that public health is maintained. Interest is the desirability of the high contents of some of the functional properties of the leaves including minerals

such as iron, sodium and zinc, which are important nutritional indicators of the usefulness of the plant as a likely feed resource. Thus taken together, the results reported in the current study therefore show that *A. annua*, when used effectively, can assist in meeting some of the important nutrient and mineral requirements of monogastric and polygastric animals. Thus the leaves and inflorescences of *A. annua* should be further explored and used fully as a feed supplement in the production of livestock (Zaidi et al., 2004; Kumar et al., 2005).

From recent studies it seems that hemaes is primarily involved in the antimalarial activity of the constituents of *A. annua* L. Thus the interaction of a mix with hemaes may represent a crucial screening test to define its efficacy. The mechanism of the action of artemisinin remains a very complex process, although iron appears to be involved in activating this endoperoxide to generate cytotoxic free radicals. Several candidates have been hypothesized as targets of artemisinin, including hemaes (Clarkson et al., 2004; Prentice, 2008; Dellicour et al., 2007). In the other side, there is an urgent need for antimalarial drugs that are affordable, effective against susceptible and multi-drug resistant malaria, and that have low toxicity. It is important to highlight that any use of tisane to treat malaria, even through *A. annua* leaves, must be followed by a physician to prevent the appearance of strains of *Plasmodium falciparum* resistant to this new line of antimalarial drug.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge the Luxembourg IFBV NGO, The Institute for Applied Nuclear Technology and Bacteriology and Virology Laboratory at Aristide Le Dantec Hospital Cheikh Anta Diop University for their kind helps in this study.

REFERENCES

- Ajasa AMO, Bello MO, Ibrahim AO, Ogunwande IA, Olawore NO (2004). Heavy trace metals and macronutrients status in herbal plants of Nigeria. *Food Chem.*, 85: 67-71.
- Ashraf W, Mian AA (2008). Levels of Selected Heavy Metals in Black Tea Varieties Consumed in Saudi Arabia. *Bull Environ. Contam. Toxicol.* 81: 101-104.
- Baqai AH, Zaman K, Persson LA, Arifeen SE, Yunus M, Begum N, Black RE (2003). Simultaneous weekly supplementation of iron and zinc is associated with lower morbidity due to diarrhea and acute lower respiratory infection in Bangladeshi infants. *J. Nutr.*, 133: 4150-4157.
- Basgel S, Erdemoglu SB (2006). Determination of mineral and trace elements in some medicinal herbs and their infusions consumed in Turkey. *Sci.Total Env.*, 359: 82-89.
- Black RE (2003). Zinc deficiency, infectious disease and mortality in the developing world. *J. Nutr.*, 133: 1485S-1489S.
- Brisibe EA (2006). Challenges and opportunities in the local production of artemisinin based combination therapies against malaria in Nigeria. *J. Pharm. Sci. Pharm. Pract.*, 8: 49-59.
- Brown KH, Peerson JM, Rivera J, Allen LH (2002). Effect of supplemental zinc on the growth and serum zinc concentrations of prepubertal children: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am. J. Clin. Nutr.*, 75: 1062-1071.
- Calliari I, Coniglia C, Nardi S, Tollardo AM, Callegaro R (1995). EDXRS study of lichens as biomonitoring and effects of washing procedure on element concentrations. *X-Ray Spectr.*, 24: 143-146.
- Chen YX, Yu MG, Xu J, Chen XC, Shi JY (2009). Differentiation of eight tea (*Camellia sinensis*) cultivars in China by elemental fingerprint of their leaves. *Soc. Chem. Industry-Food Agric.*, 89: 2350-2355.
- Clarkson C, Maharaj VJ, Crouch NR, Pillay P, Bhagwandien N, Smith PJ, Folb PI, Vleggaar R, Chibale K (2004). Antiplasmodial In vitro activity of medicinal plants native to or naturalized in South Africa. *J. Ethnopharmacol.*, 92: 177-191.
- Coriat AM, Gillard RD (1986). Beware the cups that cheer. *Nature*, 321: 570.
- Delhaize E, Ryan PR (1995). Aluminium Toxicity and Tolerance in Plants. *Plant Physiol.*, 107: 315-321.
- Dellicour S, Hall S, Chandramohan D, Greenwood B (2007). The safety of artemisinins during pregnancy: Press. Question Malaria J., 6:15.
- Djama AAD, Kouassi GMC, Koua AA, Ofori FG, Aboh IJK (2011). Trace Elements Analysis of Some Antiparasitic Medicinal Plants in Côte d'Ivoire Using Energy-Dispersive X-ray Fluorescence (EDXRF) Technique. *Current Res. J. Biol. Sci.*, 3(3): 209-215.
- Ferreira JFS, Janick J (1995). Production and detection of artemisinin from *Artemisia annua*. *Acta Horticultae*, 390: 41-49.
- Ferreira JFS, Ritchey KD, Cassida KA, Turner KE (2006). The cultivation of *Artemisia annua* in West Virginia and its potential in animal health. *Hort. Sci.*, 41: 965.
- Foy CD, Adams F (eds.) (1984). *Soil Acidity and Liming*. Wisconsin: American Society of Agronomy. 57- 97.
- Fung KF, Zhang ZQ, Fung KF, Zhang ZQ, Wong JWC, Wong MH (2003). Aluminum and fluoride concentrations of three tea varieties growing at Lantau Island, Hong Kong Environ. *Geochem. Health*, 25: 219-232.
- Gjorgieva D, Kadifkova-Panovska T, Ba K, Stafilov T (2011). Metallic, Trace Elements in Medicinal Plants from Macedonia. *Middle-East J. Sci. Res.*, 7(1): 109-114.
- Hayat MQ, Khan MA, Ashraf M, Jabeen S (2009) Ethnobotany of the genus *Artemisia* L. (Asteraceae) in Pakistan. *Ethnobot. Res. Appl.*, 7: 147-162.
- Jabeen S, Shah TM, Khan S, Hayat QM (2010). Determination of major and trace elements in ten important folk therapeutic plants of Haripur basin, Pakistan. *J. Med. Plants. Res.*, 4(7): 559-66.
- Karimi G, Hasanzadeh MK, Nili A, Khashayarmanesh Z, Samiei Z, Nazari F, Teimuri M (2008). Concentrations and health risk of heavy metals in tea samples marketed in Iran. *Pharmacol. Online*, 3: 164-174.
- Kidd PS, Proctor J (2000). Effects of aluminum on the growth and mineral composition of *Betula pendula* Roth *J. Exp. Bot.* 51: 1057-1066.
- Kitsa V, Liou PJ, Chow JC, Watson JG, Shupack S, Howell T, Sanders P (1992). *Handbook Aerosol Sci. Technol.*, 17: 213.
- Koch KR (1990). Quantitative determination of aluminum in tea by means of Aluminium-27 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Analyst*, 115: 823-825.
- Kochian LV (1995). How do crop plants tolerate acid soils: Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 46: 237-260.
- Koe H, Sari H (2009). Trace metal contents of some medicinal, aromatic plants and soil samples in the Mediterranean region, Turkey. *J. Appl. Chem. Res.*, 8: 52-57.
- Kordas K, Stoltzfus RJ, (2004) New evidence of iron and zinc interplay at the enterocyte and neural tissues. *J. Nutr.*, 134: 1295-1298.
- Kumar A, Nair AGC, Reddy AVR, Garg AN (2005). Analysis of essential elements in Pragyapeya a herbal drink and its constituents by neutron activation. *J. Pharma. Biomed. Anal.*, 37: 631.
- Maiga A, Diallo D, Bye R, Paulsen BS (2005). Determination of some toxic and essential metal ions in medicinal and edible plants from Mali. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 2316-2321.
- Malebo HM, Tanja W, Cal M (2009). Antiplasmodial, Anti-trypanosomal, Anti-leishmanial and Cytotoxicity Activity of Selected Tanzanian Medicinal Plants. *Tanzania J. Health Res.*, 11(4): 226-34.
- Markowick AA, Grieken V (1993). *Handbook of X-ray Spectrometry*, Eds, Marcel Dekker, Inc., New York.
- Marques MI, Carvalho ML, Oblad M, Amorim P, Ramos MI (1993).

- EDXRF analysis of trace elements in *Nerium oleander* for pollution monitoring. *X-Ray Spectrom.*, 22: 244.
- Matsumoto H, Hirasawa E, Morimura S, Takahashi E (1976). Localization of aluminum in tea leaves. *Plant Cell Physiol.*, 17: 627-631.
- Mueller MS, Karhagomba IB, Hirt HM, Wemakor E (2000). The potential of *Artemisia annua* L. as a locally produced remedy for malaria in the tropics: Agricultural, Chemical and Clinical aspects. *J. Ethnopharmacol.*, 73: 487-493.
- Ostachowicz J, Ostachowicz B, Holynska B, Baran W (1995). "Application of EDXRF in a survey of concentration of Lead, Zinc and Arsenic in soil from selected areas in Krakow, Poland", *X-ray Spectrometry*, 24(2): 81-83.
- Poblete VH (1995). Regional training course for sampling, sample preparation and Data Evaluation for Multielemental and Radionuclide Analysis by Nuclear and Instrumental Methods CCEN, Santiago, 19 pages.
- Powell JJ, Burden TJ, Thompson RPH (1998). In vitro mineral availability from digested tea: a rich dietary source of manganese. *Analyst*, 123: 1721-1724.
- Prentice AM (2008). Iron Metabolism, Malaria, and Other Infections: What Is All the Fuss About? *J. Nutr.*, 138: 2537-2541.
- Rajurkar NS, Damame MM (1998). Mineral Content of Medicinal Plants used in the treatment of diseases resulting from Urinary Tract Disorders. *Appl. Radiat. Isot.*, 49(7): 773-776.
- Rao JKS (1994). Aluminum content in tea leaves and in differently prepared tea infusions. *Die Nahrung*, 38: 533-537.
- Ruan J, Wong MH (2001). Accumulation of fluoride and aluminum related to different varieties of tea plant. *Environ. Geochem. Health* 23: 53-63.
- Salvador MJ, Lopes GN, Filho VFN, Zucchi OLAD (2002). Quality control of commercial tea by X-ray fluorescence. *X-RAY SPECTROMETRY*, 31: 141-144.
- Shankar AH, Prasad AS (1998). Zinc and immune function: The biological basis of altered resistance to infection. *Am. J. Clin. Nutr.*, 68: 447S-463S.
- Sheddy GM, Pulford ID, Hamed IA (2006). Presence of major and trace elements in seven medicinal plants growing in the South-Eastern Desert. *Egypt. J. Arid Env.*, 66: 210-217.
- Shen FM, Chen HW (2008). Element Composition of Tea Leaves and Tea Infusion and Its Impact on Health. *Bull Environ. Contam. Toxicol.*, 80: 300-304.
- Vincze L, Janssens K, Adams F (1993). A general Monte Carlo simulation of energy-dispersive X-ray fluorescence spectrometers-I: Unpolarized radiation, homogeneous samples. *Spectrochim Acta*, 48B: 553.
- Wong MH, Zhang ZQ, Wong MH, Zhang ZQ, Wong JWC, Lan CY (1998). Trace metal contents (Al, Cu and Zn) of tea: tea and soil from two tea plantations, and tea products from different provinces of China. *Environ. Geochem. Health*, 20(2): 87-94.
- Zaidi JH, Fatima I, Qureshi IH, Subhani MS (2004). Trace element evaluation of some medicinal herbs by instrumental neutron activation analysis. *Radiochim Acta*, 92: 363-368.
- Zhou CY, Wu J, Chi H, Wong MK, Kho LL, Wee YC (1996). The behaviour of leached aluminum in tea infusions. *The Sci. Total Environ.*, 177: 9-16.
- Zimmermann MB, Chassard C, Rohner F, N'Goran EK, Nindjin C, Dostal A, Utzinger J, Ghattas H, Lacroix C, Hurrell RF (2010). The effects of iron fortification on the gut microbiota in African children: a randomized controlled trial in Côte d'Ivoire. *Am. J. Clin. Nutr.*, 92: 1406-1415.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion

L'avenir est dominé par la crainte de l'évolution des chimiorésistances, plusieurs travaux mentionnent les baisses de sensibilités des isolats de *P. falciparum* vis-à-vis des antipaludiques dans les zones d'endémies. En effet, de nouveaux principes actifs sont nécessaires pour diversifier l'arsenal thérapeutique antipaludique et traiter les formes sévères de paludisme ainsi que pour lutter contre les parasites polychimiorésistants. Il est indéniable que des molécules à mode d'action original peuvent contourner les résistances aux molécules actuelles.

La recherche de nouveaux antipaludiques restent d'actualité car l'une des raisons de l'expansion du paludisme est le manque de traitements efficaces à faible coût et accessible. De nombreuses équipes à travers le monde s'investissent dans cette quête par des stratégies diverses et variées. Au cours de notre projet, l'ethnopharmacologie de l'*A. annua*, la détermination de l'activité antipaludique *ex vivo* et la caractérisation des éléments minéraux contenus dans les feuilles cette plante, étaient les stratégies d'investigation.

La chimiosensibilité *ex vivo* des souches de *P. falciparum* par rapport à la tisane d'*A. annua* en provenance de Luxembourg, a été mesurée sur deux localités différentes du Sénégal (Pikine et Thiès) à des années différentes. Mais toute fois les résultats obtenus (dans les deux études), comparés à ceux trouvés dans la littérature, ont montré une bonne activité antipaludique de notre tisane d'*A. annua* sur les souches plasmodiales. Dans la littérature, plusieurs auteurs ont donné des limites de valeurs antipaludiques légèrement différentes. Mais toutefois ces valeurs se retrouvent, en majeur partie, dans un même intervalle. Dans notre étude nous avons comparé nos résultats avec ceux de Sauvin en 2002 (**Sauvin, 2002**) ou Malebo et al, en 2009 (**Malebo et al, 2009**). Nos valeurs de CI_{50} (0.095 µg/ml et 1,034 µg/ml), comparées à celles de Sauvin ou Malebo, ont montré une bonne activité antipaludique de notre tisane. Notre tisane Luxembourgeoise aurait une forte activité antiplasmodiale, et bien qu'elle ne soit pas trop riche en artémisinine, comparée aux autres tisanes. Ceci laisserait penser que cette forte activité antipaludique de la tisane luxembourgeoise serait due, non seulement à l'artémisinine seule, mais à l'effet combiné d'autres substances qui s'y trouvent (coumarine, scopolétines, ployphénols, flavonoïdes, camphres, microelements, etc.).

L'utilisation des plantes à visée médicamenteuse est une alternative thérapeutique des populations africaines en général et sénégalais en particulier, dans le traitement ou la prophylaxie antipaludique, ceci à cause du coût élevé, mais surtout à l'inaccessibilité aux médicaments, et parce que l'expérience a montré une efficacité thérapeutique. Par notre

collaboration avec l'ONG Luxembourgeoise, IFBV, l'activité antipaludique *ex vivo* de l'A. *annua* a été prouvée, par la suite, la caractérisation des éléments minéraux contenus dans les feuilles de la plante a été déterminée. Ce travail a permis de valider scientifiquement l'efficacité *ex vivo* de l'A. *annua* sur des souches plasmodiales chloroquinorésistantes au Sénégal. Elle est couplée à une étude sur la caractérisation des éléments minéraux contenus dans les feuilles de l'A. *annua*. Cette partie est importante car, il est important de connaître la composition minérale de la tisane, parceque certains éléments essentiels, peuvent devenir toxiques à concentrations élevées. De même la présence de certains éléments (métaux lourds par exemple), peuvent s'avérer toxiques même à des doses faibles. Les résultats obtenus ont montré la présence d'éléments essentiels dans notre tisane. Ceci vient amplifier l'efficacité antipaludique de notre tisane.

Du point de vue technique, l'évaluation de la chimiosensibilité *ex vivo* a été faite avec des méthodes et technologies très sophistiquées et pointues à savoir le DAPI-test et le DELI-test. Ces techniques peuvent être utilisées sur le terrain et constitue une alternative par rapport aux autres méthodes d'étude de la résistance qui utilisent soit la radioactivité. Elle peut être d'une grande importance surtout dans les pays pauvres caractérisés par une limitation des ressources humaines et financières. En effet elle offre la possibilité de déterminer en une fois sur une même plaque les concentrations inhibitrices de différents médicaments. Concernant la caractérisation des éléments minéraux, nous avons utilisé une technique de laser très originale à savoir le LIBS. L'application de cette méthode physique à la biologie est très innovatrice. Cela permet une synergie de la physique et de la biologie dans la trouvaille de nouveaux moyens plus efficaces dans la lutte et le contrôle du paludisme en particulier et les autres maladies en général.

Perspectives

En perspectives, du fait que le paludisme continue d'être un problème de santé publique en Afrique subsaharienne, malgré la baisse de la mortalité, l'élargissement de ce projet pilote pourrait être une aubaine pour l'Afrique de lutter contre ce fléau désastreux. Des études ont montré que l'artémisinine présente dans la tisane d'artémisia possède la vertu additionnelle de renforcer le système immunitaire (**Willcox et al., 2004**). Donc des études multidisciplinaires sur d'autres infections comme le VIH/SIDA et des maladies parasitaires s'avèrent importantes pour lutter contre ces fléaux qui menacent le monde. Nous suggérons aussi de mener des études couplées *in vitro/in vivo* en y associant l'étude des marqueurs

génétiques de la résistance. Cette synergie d'études pourrait contribuer à mieux évaluer l'efficacité réelle de ces différents médicaments sur les souches de *P. falciparum* et mieux documenter la résistance au Sénégal.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- **Abdullah, S., Adazu K., Masanja H., Diallo D., Hodgson A., Ilbouolo-Sanogo E., Nhacolo A., Owusu-Agyei S., Thompson R., Smith T., Binka F.N. 2007.** Patterns age-specific mortality in children in endemic areas of Sub-saharan Africa. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 50, 771-776
- 2- **Abuja declaration. 2000.** The African Head of States Summit on *Roll Back Malaria*. Abuja, 25 April 2000 (WHO/CDS/RBM/2000, 17). WHO/CDS/RBM, Abuja, Nigeria
- 3- **Agram, M.S. 1990.** Studies on zinc in wound healing. *Acta Darm. Venereol. Suppl.* (Stockh), 154, 1-36
- 4- **Agtmael (van), M.A., Eggelte T.A., Boxtel (van) C.J. 1999.** Artemisinin drugs in the treatment of malaria: from medicinal herb to registered medication. *Trends Pharmacol. Sci.*, 20, 199-205.
- 5- **Ajasa, M.A., Bello O.M., Ibrahim O.M., Ogunwande A.I., Olawore O.N. 2004.** Heavy trace metals and macronutrients status in herbal plats of Nigeria. *Food Chem.*, 85, 67-71
- 6- **Akerele, O. 1984.** WHO's traditional medicine program: progress and perspectives. *WHO Chronicle*, 38, 76
- 7- **Akubue, P.I. and Mittal G.C. 1982.** Clinical evaluation of a traditional herbal practice in Nigeria: a preliminary report. *Journal Ethnopharmacology*, 6, 355
- 8- **Alin, M.H., Ashton M., Kihamia C.M., Mtev G.J., Björkman A. 1996a.** Clinical efficacy and pharmacokinetics of artemisinin monotherapy and in combination with méfloquine in patients with falciparum malaria. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 41, 587-92
- 9- **Alin, M.H., Björkman A. 1994.** Concentration and time dependency of artemisinin efficacy against *Plasmodium falciparum* in vitro. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 50, 771-76
- 10- **Alker, A.P., Lim P., Sem R., Shah N.K., Yi P., Bouth D.M., Tsuyuoka R., Maguire J.D., Fandeur T., Ariey F., Wongsrichanalai C., Meshnick S.R. 2007.** Pfmdr1 and in vivo resistance to artesunate mefloquine in falciparum malaria in the Cambodian-Thai border. *Am., J., Trop., Med., Hyg.*, 76, 641-647
- 11- **Anke, M., Groppel B., Kronemann H., Bratter P., Schramel P. 1984.** (Eds.). *Trace elem-anal chem med Biol.*, 3, 421.
- 12- **Arceusz, A., Radecka I., Wesolowski M. 2010.** Identification of diversity in elements content in medicinal plants belonging to different plant families. *Food Chem.*, 120, 52-58.

- 13- **Arreersisom, P., Dondorp A.M., Looareesuwan S., and Udomsangpetch R. 2007.** Suppressive effects of the anti-oxidant N-acetylcysteine on the anti-malarial activity of artesunate. *Parasitol. Int.*, 56, 221-6.
- 14- **Ashley, E.A., Pinoges L., Turyakira E., Dorsey G., Checchi F., Bukirwa H., van den Broek I., Zongo I., Palma Urruta P.P., van Herp M., Balkan S., Taylor W.R., Olliaro P., Guthmann J.P. 2008.** Different methodological approaches to the assessment of in vivo efficacy of three artemisinin-based combination antimalarial treatments for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in Africa children. *Malaria Journal*, 7, 154
- 15- **Ashley E.A., White N.J. 2005.** Artemisinin-based combinations. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 18, 531-536.
- 16- **Ashton, M., Nguyen D.S., Nguyen V.H., Gordi T., Trinh N.H., Dinh X.H., Nguyen T.N., Le D.C. 1998.** Artemisinin Kinetics and dynamics during oral and rectal treatment of uncomplicated malaria. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 63, 482-493.
- 17- **Associations des diététiciens des Etats Unis et du Canada, 2003.** Position of the American Dietetic Association and Dietitians of Canada. *Journal of the American Dietetic Association*, 103, 748-765.
- 18- **Barnes, K.I., White, N.J. 2005.** Population biology and antimalarial resistance: The transmission of antimalarial drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Acta Tropica*, 94, 230-240.
- 19- **Barradell, L.B., Fitton, A. 1995.** Artesunate. A review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of malaria. *Drugs* 50, 714-741.
- 20- **Basco, L.K., Ringwald P. 2000.** Molecular epidemiology of malaria in Yaounde, Cameroon. VI. Sequence variations in the *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene and *in vitro* resistance to pyrimethamine and cycloguanil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 62, 271-276
- 21- **Basgel, S., Erdemoglu S.B. 2005.** Determination of mineral and trace elements in some medicinal herbs and their infusions consumed in Turkey. *Sci. Total Env.*, 359, 82-89.
- 22- **Baysal, A. 2002.** Fundamentals of Nutrition, Hatipoğlu Press, Ankara (in Turkish) 14 (2002).
- 23- **Beard, J.L. 2001.** Iron biology in immune function, muscle metabolism and neuronal

- functioning. *J. Nutr.*, 131, 568S–579S.
- 24- **Bell, D.J., Molyneux M.E. 2007.** Treatment of childhood *Plasmodium falciparum* malaria : current challenges. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 5, 141–152
- 25- **Benoit-Vical, F., Robert A., and Meunier B. 2000.** *In vitro* and *in vivo* potentiation of artemisinin and synthetic endoperoxide antimalarial drugs by metalloporphyrins. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44, 2836-2841.
- 26- **Bhakuni, D.S., Goel A.K., Jain S., Mehrotra B.N., Patnaik G.K., Prakash V. 1988.** Screening of Indian plants for biological activity: part XIII. *Indian Journal of Experimental Biology* 26, 883–904.
- 27- **Bhakuni, D.S., Goel A.K., Jain S., Mehrotra B.N., Srimal R.C. 1990.** Screening of Indian plants for biological activity: part XIV. *Indian Journal of Experimental Biology*, 28, 619–637
- 28- **Bhakuni, D.S., Jain D.C., and Sharma R.P. 2002.** Phytochemistry of *Artemisia annua* and the development of artemisinin-derivated antimalarial agents. *In Artemisia, Wright, C.W., Ed. Taylor & Francis, London*
- 29- **Bilia, A.R., Lazari D., Messori L., Taglioli V., Temperini C and Vinvieri F.F. 2002.** Simple and rapid physico-chemical methods to examine action of antimalarial drugs with hemin: its application to *Artemisia annua* constituents. *Life Sci.*, 70, 769-778
- 30- **Black, R.E. 2003.** Zinc deficiency, infectious disease and mortality in the developing world. *J. Nutr.*, 133, 1485S–1489S
- 31- **Blanke, C.H., Naisabha G.B., Balema M.B., Mbaruku G.M., Heide L., Müller S.M. 2008.** Herba *Artemisia annua* tea preparation compared to sulfadoxine-pyrimethamine in the treatment of uncomplicated falciparum malaria in adults: a randomized double blind clinical trial. *Trop. Doct*, 38, 113-6.
- 32- **Bohm, H., Boeing H., and Hempel J. 1998.** Flavonols, flavones and anthocyanins as natural antioxidants in food and their possible role in the prevention of chronic diseases. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft*, 37, 147-63.
- 33- **Bosman, A., Mendis K.N. 2007.** A major transition in malaria treatment: the adoption and deployment of artemisinin-based combination therapies. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 77, 193–197.

- 34-** **Bourzeix, M., Weiland, D., and Heredia, N. 1986.** A study of catechins and procyanidins of grape clusters, the wine and other by-product of the wine. *Bulletin de l.O.I.V* 669-670, 1986. 1173-254
- 35-** **Bowman, S., Lawson D., Bashman D., Chillingworth T., Churcher C. M., Craig A., Davies R.M., Delvin K., Feltwell T. 1999.** The complete nucleotide sequence of chromosome 3 of *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 400, 532-538.
- 36-** **Bown, D. 1995.** Encyclopedia of Herbs and Their Uses (RHS). DK Publishing (Dorling Kindersley), London
- 37-** **Bravo, J.A., Sauvain M., Gimenez A., Massiots G., Deharo E., Lavand C. 2003.** A contribution to attenuation of health problems in Bolivia: Bioactive natural compounds from natives plants reported in traditional medicine. *Revista Boliviana de Quimica* 20, 11.
- 38-** **Breman, J.G., Alilio M.S., Mills A., 2004.** Conquering the intolerable burden of malaria: what's new, what's needed: a summary. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 71, 1-15.
- 39-** **Brewer, T.G., Genovese R.F., Newman D.B., Li Q. 1998.** Factors relating to neurotoxicity of artemisinin antimalarial drugs 'listening to arteether'. *Med. Trop.*, 58, 22-27.
- 40-** **Brewer, T.G., Peggins J.G., Grate S.J., Petras J.M., Levine B.S., Weina P.J. 1994.** Neurotoxicity in animals due to arteether and artéméther. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 88, 33-36
- 41-** **Brisibe, E.A. 2006.** Challenges and opportunities in the local production of artemisinin based combination therapies against malaria in Nigeria. *J. Pharm. Sci. Pharm. Pract.*, 8, 49-59.
- 42-** **Brisibe, E.A., Umoren U.E., Brisibe F., Magalhaes P.M., Ferrira J.F.S., Luthria D., Wu X., Prior R.L. 2009.** Nutritional characterization and antioxidant capacity of different tissues of *Artemisia annua L.* *Food Chemistry*, 115, 1240-1246.
- 43-** **Brooker, S., Akhwale, W., Pullan, R., Estambale, B., Clarke, S.E., Snow, R.W., Hotez, P.J., 2007.** Epidemiology of Plasmodium-helminth co-infection in Africa: populations at risk, potential impact on anemia, and prospects for combining control. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 77, 88-98.

- 44- **Bruce-Chwatt, L.J. 1982.** Qinquaosu: a new antimalarial. *Br. Med. J.*, 284, 767-768
- 45- **Bundy DAP, Shaeffer S, Jukes M, Beegle K, Gillespie A, Drake L, Seung-heem FL, Hoffman AM, Jones J, Mitchell A, Wright C, Barcelona D, Camara B, Golmar C, Savioli L, Takeuchi T, Sembene M. 2006.** School based health and nutrition programs. In: *Disease Control Priorities for Developing Countries*. Edited by Jamison D, Breman J, Meacham A, Alleyne G, Claeson M, Evans DB, Jha P, Mills A, Musgrove P. New York: *Oxford University Press*; 1091-1108
- 46- **Calliari, I., Coniglia C., Nardi S., Tollardo A.M., Callegaro R. 1995.** EDXRS study of lichens as biomonitor and effects of washing procedure on element concentrations. *X-Ray Spectr.*, 24, 143-146
- 47- **CDC. 2004.** Malaria: geographic distribution, <http://www.cdc.gov/malaria/distribution.epi/distribution.htm>.
- 48- **Chang, H.M. and But P.P.M. 1986.** Pharmacology and Applications of Chinese Materia Medica, Vol. 1. World Scientific Publishing, Singapoure
- 49- **Charmot, G., and J. Coulaud. 1988.** Actualités sur l'extension de la chimiorésistance de *Plasmodium falciparum*: causes et conséquences. *Médecine et Maladies Infectieuses Spécial Novembre*, 655-662.
- 50- **Chen, K.S., Tseng C.L. and Lin T.H. 1993.** Trace elements in natural drugs determined by INAA. *J. Radioanal. Nucl. Chem. Articles*, 170, 265-280
- 51- **Chin, W., Coatney G.R. 1971.** Relapse activity in sporozoite-induced infections with a West African strain of *Plasmodium ovale*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 20, 825–827.
- 52- **Chiung-Sheue Chen Liu, K., Yang S.L., Robert M.F., Elford B.C., Phillipson J.D. 1992.** Antimalarial activity of Artemisia annua flavonoids from whole plants and cell cultures. *Plant Cell Reports*, 11, 637-40
- 53- **Clark, R.L. 2009.** Embryotoxicity of the artemisinin antimalarials and potential consequences for use in women in the first trimester. *Reprod Toxicol*. 2009 Epub ahead of print
- 54- **Clark R.L., Arima A., Makori N. 2008.** Artesunate: developmental toxicity and toxicokinetics in monkeys. *Birth. Defects. Res.*, 83, 418–434.
- 55- **Collins, W.E., Jeffery, G.M., 2007.** *Plasmodium malariae*: parasite and disease. *Clinical Microbiology Reviews* 20, 579–592.

- 56-** **Commission Regulation (EC). 2001.** Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Communities*. No. 466/2001 of 8 March 2001
- 57-** **Cubukcu, B., Bray D.H, Warhurst D.C., Mericli A.H., Ozhatay N. and Sariyar G. 1990.** In vitro antimalarial activity of crude extracts and compounds from *Artemisia abrotanum L.* *Phytother. Res.*, 4, 203-204
- 58-** **Cui, L. and Su X-z. 2009.** Discovery, mechanisms of action and combination therapy of artemisinin. *Exp. Rev. Inf. Ther.*, 7, 999-1013.
- 59-** **Darinka, G., Tatjana K-P., Katerine B and Traj eS. 2011.** Metalic Trace element in Medicinal Plants from Macedonia. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 7, 109-114
- 60-** **Davis, T.M., Karunajeewa H.A., Ilett K.F. 2005.** Artemisinin-based combination therapies for uncomplicated malaria. *Med. J. Aust.*, 182, 181–185.
- 61-** **Day, K. P., Karamalis F., Thompson J., Barnes D. A., Peterson C., Brown H., Brown G. V., Kemp D.J. 1993.** Genes necessary for expression a virulence determinant and for transmission of *Plasmodium falciparum* are located on a 0, 3 mega base region of chromosome 9. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 90, 8292-8296.
- 62-** **Deans, S.G. and Kennedy A.I. 2002.** *Artemisia absinthium. In Artemisia*, Wright, C.W., Ed. Taylor & Francis, London
- 63-** **Delabays, N. 1997.** Biologie de la reproduction chez l'*Artemisia annua L.* et génétique de la reproduction en artémisinine. Thèse de Doctorat, Faculté des Sciences. Université de Lausane
- 64-** **Delabays, N., Simonnet, X., Gaudin, M., 2001.** The genetics of artemisinin content in *Artemisia annua L.* and the breeding of high yielding cultivars. *Current Medicinal Chemistry* 8, 1795–1801.
- 65-** **Delaveau, P. 1982.** Histoire et renouveau des plantes medicinales, 383 pages. Albin Michel, Paris.
- 66-** **Dellicour, S., Hall S., Chandramohan D., Greenwood B. 2007.** The safety of artemisinins during pregnancy: a pressing question. *Malaria Journal* 6, 15.

- 67- Delplace, P., Fortier B., Tronchin G., Dubremetz J.F., Vernes A. 1987.** Localization biosynthesis, processing and isolation of a major 126 KDa antigen of the parasitophorous vacuole of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 23, 193-201
- 68- De Malaghaes, P.M., Debrunner N. and Delabays N. 2003.** Aqueous Extracts of *Artemisia annua* L. Paper presented at the International Conference on Malaria: current Status and Future Trends, Chulabhorn Research Institute, Bangkok, Thailand, February 16-19
- 69- De Ridder, S., van der Kooy F., Verpoorte R. 2008.** *Artemisia annua* as a self reliant treatment for malaria in developing countries. *Journal of Ethnopharmacology*, 120, 302-314
- 70- Devonshire, A.L., Field L.M. 1991.** Gene amplification and insecticide resistance. *Annu. Rev. Entomol.*, 36, 1-23.
- 71- Dhingra, V., Pakki S.R. and Narasu M.L. 2000.** Antimicrobial activity of artemisinin and its precursors. *Curr. Sci.*, 78, 709-713
- 72- Diagne, N., Fontenille D., Konaté L., Faye O., Lamizana M. T., Legros F., Molez J. F., Trape J. F. 1994.** *Bulls. Soc. Path. Ex.*, 87, 267-277.
- 73- Diallo, S., Konaté L., Ndir O., Dieng T., Dieng Y., Bah I. B., Faye O., Gaye O. 2000.** Le paludisme dans le district sanitaire centre de Dakar (Sénégal) : Données entomologiques, parasitologiques et cliniques. *Cahiers Santé*, 10, 221-229.
- 74- Djama, A.A.D, Kouassi Goffri M.C., Koua A. A., Ofosu F.G. and Aboh I.J.K. 2011.** Trace Elements Analysis of Some Antiparasitic Medicinal Plants in Côte d'Ivoire Using Energy-Dispersive X-ray Fluorescence (EDXRF) Technique. *Current Research Journal of Biological Sciences*, 3, 209-215.
- 75- Dondorp, A., Nosten F., Yi P. 2009.** Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N. Engl. J. Med.*, 361, 455-67.
- 76- Dong, K. A. 1997.** Single amino acid change in the para sodium channel protein is associated with knockdown-resistance (kdr) to pyrethroid insecticides in German cockroach. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 27, 93-100.
- 77- Druilhe, P., Moreno A., Blanc C. 2001.** A colorimetric *in vitro* drug sensitivity assay for *Plasmodium falciparum* based on a highly sensitive double-site lactate dehydrogenase antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Trop.*

- Med. Hyg.* 64:233-241.
- 78- **Duc, D.D., Vries (de) P.J., Le Nguyen B., Kager P.A., Boxtel (van) C.J. 1994.** The pharmacokinetics of a single dose of artemisinin in healthy Vietnamese subjects. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 51, 785-90
- 79- **Eastman, R.T., Fidock D.A. 2009.** Artemisinin-based combination therapies: a vital tool in efforts to eliminate malaria. *Nat. Rev. Microbiol.*, 7, 864-74.
- 80- **Eckstein-Ludwig, U., Webb, R.J., Van Goethem, I.D., East, J.M., Lee, A.G., Kimura, M., O'Neill, P.M., Bray, P.G., Ward, S.A., Krishna, S., 2003.** Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 424, 957-961.
- 81- **Efferth, T. 2007.** Willmar Schwabe Award 2006: antiplasmodial and antitumor activity of artemisinin—from bench to bedside. *Planta Medica* 73, 299–309.
- 82- **Elford, B.C., Robert M.F., Phillipson J.D., Wilson R.J.M. 1987.** Potentiation of the antimalarial activity of qinghaosu by methoxylated flavones. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 81, 434-6
- 83- **Farnsworth, N.R., Akerele O., Bingel A.S., Soejarto D.D., Guo Z. 1985.** Medicinal plants in therapy. *Bull. WHO*, 63, 965
- 84- **Faye, O., Fontenille D., Gaye O., Sy N., Molez J. F. 1995a.** Paludisme et riziculture dans le delta du fleuve Sénégal. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.*, 75, 179-180.
- 85- **Faye, O., Konaté L., Gaye O., Fontenille D., Molez J. F. 1995b.** Quelques aspects épidémiologiques du paludisme au Sénégal. *Article de Revues*, 3-7.
- 86- **Ferreira, J.F., Luthoria D.L., Sasaki T., Heyerick A. 2010.** Flavonoids from *Artemisia annua* as antioxydants and their potential synergism with Artemisia against malaria and cancer. *Molecules*, 15, 3135-3170.
- 87- **Ferreira, J.F.S., Ritchey K.D., Cassida K.A., Turner K.E. 2006.** The cultivation of *Artemisia annua* in West Virginia and its potential in animal health. *Hort. Sci.*, 41, 965.
- 88- **Ferreira, J.F.S., Simon J.E., and Janick J. 1995a.** Developmental studies of *Artemisia annua*: flowering and artemisinin production under greenhouse and field conditions. *Planta Med.*, 61, 167-170.
- 89- **Ferreira, J.F.S., Simon J.E., and Janick J. 1995b.** Relationship of artemisinin content of tissue-cultured, greenhouse-grown and field-grown plants of *Artemisia annua*. *Planta Med.*, 61, 351-355.

- 90- **Ferreira, J.F.S., Simon J.E., and Janick J. 1997.** *Artemisia annua*: botany, horticulture, pharmacology. *Horticul. Rev.*, 19, 319-371
- 91- **Fidock, D.A., Nomura T., Talley A.K., Cooper R.A., Dzekunov S.M., Ferdig M.T., Ursos L.M., Sidhu A.B., Naude B., Deitsch K.W., Su X.Z., Wootton J.C., Roepe P.D., Wellems T.E. 2000.** Mutations in the *Plasmodium falciparum* digestive vacuole transmembrane protein pfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol., Cell.* 6, 861–871
- 92- **Fishwick, J., Edwards G., Ward S.A., and McLean W.G. 1998a.** Binding of dihydroartémisinin to differentiated neuroblastoma cells and rat cortical homogenate. *NeuroToxicology*, 19, 405-412.
- 93- **Fishwick, J., Edwards G., Ward S.A., and McLean W.G. 1998b.** Morphological and immunocytochemical effects of dihydroartemisinin and differentiating NB2a neuroblastoma cells. *NeuroToxicology*, 19, 393-403
- 94- **Fishwick, J., McLean W.G., Edwards G. and Ward S.A. 1995.** The toxicity of artemisinin and related compounds on neuronal and glial cells in culture. *Chem. Biol. Interact.*, 96, 263-271.
- 95- **Francois, G., Dochez C., Jaziris M. and Laurent A. 1993.** Antiplasmodial activity of sesquiterpene lactones and other compounds in organic extracts of *Artemisia annua*. *Planta Med.*, 59, A677-A678
- 96- **Fung, K.F., Zhhang Z.Q., Wong J.W.C., Wong M.H. 2003.** Aluminium and fluoride concentrations of three teas varieties growing at Lantau Island. *Hong Kong Environ. Geochem. Health.* 25, 2199-232
- 97- **Gaye, O., Faye O., Bah I.B., Diallo S., Diouf M., Ndiaye P., Ndiaye A.A., Trape J.F. 1991.** Development of chloroquine resistance in an urban area. Results of surveys in Dakar and Pikine. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.*, 71, 320-30
- 98- **German, P. I., and Aweeka F.T. 2008.** Clinical pharmacology of artemisinin-based combination therapies. *Clin. Pharmacokinet.*, 47, 91-102.
- 99- **Gessler, M. 1994.** The Antimalarial potential of Medicine Plants Traditionally Used in Tanzania and their Use in the Treatment of Malaria by Traditional Healers. PhD. Dissertation, University of Basel, Basel in Switzerland.
- 100- **Girre, L. 1985.** Nouveau Guide des vieux remèdes naturels, 314 Pages. Ouest-France, Rennes. ISBN2-85882860-1

- 101-** **Golenser, J., Waknine J.H., Krugliak M., Hunt N.H., Grau G.E. 2006.** Current perspectives on the mechanism of action of artemisinins. *International Journal of Parasitology*, 36, 1427–1441
- 102-** **Golvan, Y. J. 1978.** Eléments de parasitologie médicale. *FLAMMARION Médecine Sciences*, 616 pages.
- 103-** **Gordi, T., Hai T.N., Hoai N.M., Thyberg M., Ashton M. 2000.** Use of saliva and capillary blood samples as substitutes for venous blood sampling in pharmacokinetic investigations of artemisinin. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 56, 561–566.
- 104-** **Grantham-McGregor, S., and Ani C. 2001.** A review of studies on the effect of iron deficiency on cognitive development in children. *J. Nutr.*, 131, 649S–666S.
- 105-** **Group SEAQAMT. 2005.** Artesunate versus quinine for treatment of severe falciparum malaria: a randomised trial. *Lancet*, 366, 717–725.
- 106-** **Guirand, F. 1959.** Larousse Encyclopedia of Mythology. Paul Hamlyn, London
- 107-** **Haddad, D. S. G. 1999.** Limited genetic diversity of *Plasmodium falciparum* in field isolates from Honduras. *Am. J. Trop. Med. Hygiene*, 60, 30-34.
- 108-** **Halliwell, B. and Gutteridge J.M.C. 1989.** Free Radicals in Biology and Medicine, 2nd ed. Clarendon Press, Oxford
- 109-** **Harris, E.D. 1997.** Copper. In: O'Dell, B.L. and R.A. Sunde, (Eds.), Handbook of Nutritional Essential Mineral Elements. Marcel, New York, pp: 231-273.
- 110-** **Hayat, M.Q., Khan M.A., Ashraf M., Jabeen S. 2009.** Ethnobotany of the genus *Artemisia* L. (Asteraceae) in Pakistan. *Ethnobot. Res. Appl.*, 7: 147-162.
- 111-** **Haynes, R.K. 2006.** From artemisinin to new artemisinin antimalarials: biosynthesis, extraction, old and new derivatives, stereochemistry and medicinal chemistry requirements. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 6, 509–537.
- 112-** **Heide, L. 2006.** Artemisinin in traditional tea preparations of *Artemisia annua*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 100, 802.
- 113-** **Higgins, D.G., McComell D.J., Sharp P.M. 1989.** Malarial proteinase. *Nature* 340, 640.
- 114-** **Hinterberg, K., Mattei D., Wellem T.E., and Scherf S. 1994.** Interchromosomal exchange of a large subtelomeric segment in a *Plasmodium falciparum* cross. *EMBO J.*, 13, 4174-4180.
- 115-** **Hirt, H.M. 2001.** Document: *Artemisia annua* Anamed; A plant with Antimalarial Properties. Anamed, Winnenden

- 116-** **Hirt, H.M., and Lindsey K. 2000.** Natural medicine in the tropics: Experiences. Winnenden, Germany. See also [htt://www.anamed.org](http://www.anamed.org)
- 117-** **Hoffman, S. L. 1996.** Artemether in severe malaria. Still too many deaths. *The New England Journal of Medicine*, 335, 124-126.
- 118-** **Hong, Y.L., Yang Y.Z., and Meshnick S.R. 1994.** The interaction of artemisinin with malarial haemozooin. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 63, 121-128.
- 119-** **Houzé, S. Munier A., Paoletti X., Kaddouri H., Ringwald P., Le B. 2007.** Shelf Life of Predosed Plates Containing Mefloquine, Artemisinin, Dihydroartemisinin and Artesunate as Used for *In Vitro Plasmodium falciparum* Susceptibility Assessment. *J. Clin. Microbiol.*, 45, 2734-36
- 120-** **Hsu, E., 2006a.** The history of qing hao in the Chinese *materia medica*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 100, 505–508.
- 121-** **Hsu, E. 2006b.** Reflections on the “discovery” of the antimalarial qinghao. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 61, 666-670
- 122-** **Huang, P.L., Huang P.L., Huang P., Huang H.I., Lee-Huang S. 1992.** Developing drugs from traditional medicinal plants. *Chem. Ind.* 290
- 123-** **Huda, S., Shahab T., Ali S., Afzal K., and Khan H. 2003.** Comparative clinical trial of artemether and quinine in children with severe malarial. *Indian Pediatr. A*, 40, 293-345.
- 124-** **Ilett, K.F., Ethell B.T., Maggs J.L. 2002.** Glucuronidation of dihydroartemisinin *in vivo* and by human liver microsomes and expressed UDP-glucuronosyltransferases. *Drug. Metab. Dispos.*, 30, 1005–1012.
- 125-** **Imelouane B., Tahri M., Elbastrioui M., Aouinti F., Elbachiri A. 2011.** Mineral Contents of Some Medicinal and Aromatic Plants Growing in Eastern Morocco. *J. Mater. Environ. Sci.*, 2, 104-111
- 126-** **Isozumi, R., Uemura H., Le D.D., Truong V.H., Nguyen D.G., Ha V.V., Bui Q.P., Nguyen V.T., Nakazawa S. 2010.** Longitudinal survey of *Plasmodium falciparum* infection in Vietnam: characteristics of antimalarial resistance and their associated factors. *J., Clin., Microbiol.* 48, 70–77

- 127- **Jabeen, S., Shah M.T., Sardar Khan S. and Hayat M.Q. 2010.** Determination of major and trace elements in ten important folk therapeutic plants of Haripur basin, Pakistan. *Journal of Medicinal Plants Research.*, 4, 559-566.
- 128- **Jansen, F.H. 2006.** The herbal tea approach for artemisinin as a therapy for malaria? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 100, 285-286.
- 129- **Jansen, F.H., Soomro, Shahid A. 2007.** Chemical Instability Determines the Biological Action of the Artemisinins. *Current Med., Chemistry*, 14, 3243-59.
- 130- **Kamchonwongpaisan, S., Mckeever P., Houssier P., Ziffer H. and Meshnick S.R. 1997.** Artemisinin neurotoxicity: neuropathology in rats and mechanistic studies *in vitro*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 56, 7-12
- 131- **Kanias G.D., Loukis A. 1987.** Determination and correlation of active constituents and trace elements in the medicinal plants *Thymus capitatus* Hffm. and Link, Frezenius Z. *Analyt. Chem.*, 327, 355-357.
- 132- **Kapoor, R., Chaudhary V., Bhatnagar A.K. 2007.** Effects of arbuscular mycorrhiza and phosphorus application on artemisinin concentration in *Artemisia annua* L. *Mycorrhiza*, 17, 581-7
- 133- **Kitsa,, V., Lioy P.J., Chow J.C., Watson J.G., Shupack S., Howell T., Sanders P. 1992.** Handbook Aerosol Sci. Technol, 17, 213
- 134- **Kılıç, S and Köse, G. 2001.** *World Food* (5), (2001) 72–75 (in Turkish).
- 135- **Kim, B.J., Sasaki, T., 2004.** Synthesis of *O*-aminodihydroartemisinin via TMS triflate catalyzed C–O coupling reaction. *Journal of Organic Chemistry* 69, 3242–3244.
- 136- **Koche, D. 2011.** Trace element analysis and vitamins from an Indian medical plant *Nepeta hindostana* (Roth) Haines. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2, 53-54.
- 137- **Koe, H., Sari H. 2009.** Trace metal contents of some medicinal, aromatic plants and soil samples in the Mediterranean region, Turkey. *J. Appl. Chem. Res.*, 8, 52-57
- 138- **Kraft, C., Jenett-Siems K., Siems K. 2003.** *In vitro* antiplasmodial evaluation of medicinal plants from Zimbabwe. *Phytother. Res.*, 17, 123-128
- 139- **Krogstad, D.J., Gluzman I.Y., Kyle D.E., Oduala A.M., Martin S.K., Milhous W.K., Schlesinger P.H. 1987.** Efflux of chloroquine from *Plasmodium falciparum*:

- mechanism of chloroquine resistance. *Science*, 238, 1283–1285
- 140-** **Kublin, J.G., Cortese J.F., Njunju E.M., Mukadam A.G., Wirima J.J., Kazembe P.N., Djimde A.A., Kouriba B., Taylor T.E., Plowe C.V. 2003.** Reemergence of chloroquine-sensitive *Plasmodium falciparum* malaria after cessation of chloroquine use in Malawi. *J., Infect., Dis.* 187, 1870–1875
- 141-** **Kuhn T, Wang Y. 2008.** Artemisinin – an innovative cornerstone for anti-malaria therapy. *Prog. Drug. Res.*, 66, 385–422.
- 142-** **Lapkin, A.A., Plucinski, P.K., Cutler, M., 2006.** Comparative assessment of technologies for extraction of artemisinin. *Journal of Natural Products* 69, 1653–1664.
- 143-** **Laufer, M.K., Thesing P.C., Eddington N.D., Masonga R., Dzinjalama F.K., Takala S.L., Taylor T.E., Plowe C.V. 2006.** Return of chloroquine antimalarial efficacy in Malawi. *N., Engl., J., Med.* 355, 1959–1966
- 144-** **Laughlin, J.C., Heazlewood G.N., and Beattie B.M. 2002.** Cultivation of *Artemisia annua L.* In *Artemisia*, Wright, C.W., Ed. Taylor & Francis, London
- 145-** **Le, N.B., Pham T.Y., Nguyen B.N., Dang C.T., Pham T.L., Le D.C. 1999.** Efficacy and effectiveness of five days treatment of uncomplicated falciparum with artemisinin or artesunate in Vietnam. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 30, 3-6
- 146-** **Lee, I.S., Hufford C.D. 1999.** Metabolism of antimalarial sesquiterpene lactones. *Pharmacol. Ther.*; 48, 345–355.
- 147-** **Liang, J., Wang Q.Q., Huang B.L. 2004.** Concentration of hazardous heavy metals in environmental samples collected in Xiaman, China as determined by vapor generation non-dispersive atomic fluorescence spectrometry. *Anal. Sci.* 20, 85.
- 148-** **Li, Q.G., Peggins J.O., Fleckenstein L.L., Masonic K., Heiffer M.H., Brewer T.G. 1998.** The pharmacokinetics and bioavailability of dihydroartemisinin, arteether, artemether, artesunic acid and artelinic acid in rats. *J. Pharm. Pharmacol.*, 50, 173–182.
- 149-** **Li, Y., Wu Y.L. 1998.** How Chinese scientists discovered qinghaosu (artemisinin) and developed its derivatives? What are the future perspectives? *Med Trop.*, 58, S9–S12.
- 150-** **Lim A.S., Galatis D., and Cowman A.F. 1996.** *Plasmodium falciparum*: amplification and overexpression of pfmdr1 is not necessary for increased mefloquine resistance. *Exp. Parasitol.*, 83, 295-303.

- 151-** **Liu, C., Zhao, Y., Wang, Y. 2006.** Artemisinin: current state and perspectives for biotechnological production of an antimalarial drug. *Applied Microbiological Biotechnology*, 72, 11–20.
- 152-** **Liu, K.S., Yang S.L., Roberts M., Elford B., Phillipson J. 1992.** Antimalarial activity of *Artemisia annua* flavonoids from whole plants and cell cultures. *Plant Cell Reports*, 11, 637-640
- 153-** **Lutgen, P., and Michels P. 2008.** Bactericidal properties of *Artemisia annua* tea and dosimetry of artemisinin in water by fluorescence under UV light. Proceedings of the International Conference “Maladies Tropicales, aspects humanitaires et économiques”, Luxembourg, June 3-4 2008. *In Revue Technique Luxembourgeoise*, 2, 73-78.
- 154-** **Luxemburger, C., Ter Kuile F.O., Nosten F., Dolan G., Bradol J.H., Phaipun L., Chongsuphajaisiddhi T., and White N.J. 1994.** Single day mefloquine artenuate combination in the treatment of multi-drug resistant *falciparum* malaria. *Trans. Roy Soc. Trop. Med. Hyg.* 88, 213-217.
- 155-** **Ly, O., Gueye P.E.O., Déme A.B., Dieng T., Badiane A.S., Ahouidi A.D., Diallo M., Bei A.K., Wirth D.F., Mboup S., Sarr O. 2012.** Evolution of the pfcr7 T76 and pfmdr1 Y86 markers and chloroquine susceptibility 8 years after cessation of chloroquino use in Pikine, Senegal. *Parasitol., Res.*, 10, 2994-7.
- 156-** **Malebo, H.M, Tanja W., Cal M., Swaleh S.A., Omolo M.O., Hassanali A., Sequin U., Hamburger M., Brun R., Ndiége I.O. 2009.** Antiplasmodial, anti-trypanosomal, anti-leishmanial and cytotoxicity activity of selected Tanzanian medicinal plants. *Tanzan. J. Health Res.* 11, 226-234.
- 157-** **Manirakiza, A., Njoumo S.P., Le Faou A., Malvy D., Millet P. 2010.** Availability of antimalarial drugs and evaluation of the attitude and practices for the treatment of uncomplicated malaria in Bangui, Central African Republic. *J., Trop., Med.* 2010:510834
- 158-** **Marques, M.I., Carvalho M.L., Oblad M., Amorim P., Ramos M.I. 1993.** EDXRF analysis of trace elements in *Nerium oleander* for pollution monitoring. *X-Ray Spectrom* 22, 224
- 159-** **Mboera, L.E., Makundi E.A., Kitua A.Y., 2007.** Uncertainty in malaria control in Tanzania: crossroads and challenges for future interventions. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 77, 112–118.

- 160- **McGready, R., Cho T., Keo N.K., Thwai K.L., Villegas L., Looareesuwan S. 2001.** Artemisinin antimalarials in pregnancy: a prospective treatment study of 539 episodes of multidrug-resistant *Plasmodium falciparum*. *Clin. Infect. Dis.* 33, 2009-2016.
- 161- **McIntosh H.M., Olliaro P. 2000.** Artemisinin derivatives for treating severe malaria. *Cochrane Database Syst Rev* 2000 ;(2):CD000527.
- 162- **Means, R.T. 2009.** Ironing out complementary medicine. *Am. Soc. Hematologie*, 113, 270-271.
- 163- **Menard, D., Matsika-Claquin M.D., Djalle D. 2005.** Association of failures of seven-day courses of artesunate in a non-immune population in Bangui, Central African Republic with decreased sensitivity of *Plasmodium falciparum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 73, 616–621.
- 164- **Menendez, C., D'Alessandro U., ter Kuile F.O., 2007.** Reducing the burden of malaria in pregnancy by preventive strategies. *Lancet Infectious Diseases* 7, 126–135.
- 165- **Meshnick S.R., Taylor T.E., Kamchonwongpaisan S. 1996.** Artemisinin and the antimalarial endoperoxides: from herbal remedy to targeted chemotherapy. *Microbiol Rev*, 60, 301–315.
- 166- **Mita, T., Kaneko A., Lum K.J., Bwijo B., Takechi M., Zungu I.L., Tsukahara T., Tanabe K., Kobayakawa T., Bjorkman A. 2003.** Recovery of chloroquine sensitivity and low prevalence of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter gene mutation K76T following the discontinuance of chloroquine use in Malawi. *Am., J., Trop., Med., Hyg.* 68, 413–415
- 167- **Miller, L.G., and Panosian C.B. 1997.** Ataxia and slurred speech after artésunate treatment for falciparum malaria. *N. Engl. J. Med.*, 336, 1328
- 168- **Mueller, I., Zimmerman P.A., Reeder J.C., 2007.** *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale*-the “bashful” malaria parasites. *Trends in Parasitology* 23, 278–283
- 169- **Mueller, M.S., Karhagomba I.B., Hirt H.M., Wemakor E. 2000.** The potential of *Artemisia annua* L. as a locally produced remedy for malaria in the tropics: agricultural, chemical and clinical aspects. *J. Ethnopharmacol*, 73, 487-493.

- 170- **Mueller, M.S., Runyambo N., Wagner I., Borrman S., Dietz K., Heide L. 2004.** Randomized controlled trial of a traditional preparation of *Artemisia annua* L. (Annual Wormwood) in the treatment of malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 98, 318-321.
- 171- **Mukherejee, P.K., Kumar N.S. and Heinrich M. 2008.** Plant made pharmaceuticals (PMPs)-Development of Natural Health Products from Bio-Diversity. *Indian J. Pharm. Edu. Res.*, 42, 113-121.
- 172- **Mullis, K. 1990.** L'intervention insolite de l'amplification des gènes. *Pour la Science*, 152, 44-53.
- 173- **Mwai, L., Ochong E., Abdirahman A., Kiara S.M., Ward S., Kokwaro G., Sasi P., March K., Borrman S., Mackinnon M., Nzila A. 2009.** Chloroquine resistance before and after its withdrawal in Kenya. *Malar. J.* 8, 106
- 174- **Ndiaye, D., Patel V., Demas A., Le Roux M., Mboup S., Ndir O., Clardy J., Lakshmanan V., Daily J.P., Wirth D.F. 2010.** A non-radioactive DAPI based high throughput in vitro assay to assess *Plasmodium falciparum* responsiveness to antimalarials increased sensitivity of *P. falciparum* to chloroquine in Senegal. *AmJTrop Med Hyg* 82:228–230
- 175- **Nielsen, H. 1985.** The importance of diet composition in ultra trace element research. *J. Nutr.*, 115, 1239-1247.
- 176- **Noedl, H., Se Y., Schaecher K. 2008.** Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. *N. Engl. J. Med.*, 359, 2619-20.
- 177- **Nontprasert, A., Pukrittayakamee S., Dondorp A.M., Clemens R., Looareesuwan S., White N.J. 2002.** Neuropathologic toxicity of artemisinin derivatives in a mouse model. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 67, 423–429.
- 178- **Noranate, R., Durand R., Tall A., Marama L., Spiegel A., Sokhna C., Pradines B., Cojean S., Guillotte M., Bischoff E., Ekala M.T., Bouchier C., Fandeur T., Ariey F., Patarapotikul J., Lebras J., Trape J.F., Rogier C., Mercereau-Puijalon O. 2007.** Rapid dissemination of *Plasmodium falciparum* drug resistance despite strictly controlled antimalarial use. *PLoS ONE* 2007, 2, 139.
- 179- **Nosten, F., White N.J. 2007.** Artemisinin-based combination treatment of *falciparum* malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 77, 181-92.

- 180- **Nyarango, P.M., Gebremeskel T., Mebrahtu G. 2006.** A steep decline of malaria morbidity and mortality trends in Eritrea between 2000 and 2004: the effect of combination of control methods. *Malaria Journal*, 5, 33
- 181- **Olliaro, P.L., Nair N.K., Sathasivam K., Mansor S.M., Navaratnam V. 2001.** Pharmacokinetics of artésunate after single oral administration to rats. *BMC Pharmacol*, 1, 12.
- 182- **Olumnese, P. 2006.** WHO Guidelines for the treatment of malaria
- 183- **Onianwa, P.C., Lawal J.A., Ogunkeye A.A., Orejimi B.M. 2000.** Cadmium and nickel composition of Nigerian foods. *J. Food Compos. Anal.*, 13, 961–969
- 184- **Organisation Mondiale de la Santé. 1974.** Paludisme endémique Organisation Mondiale de la Santé Genève. Comité OMS d'experts du paludisme. Séizième rapport Genève
- 185- **Organisation Mondiale de la Santé. 1990.** Several and complicated malaria. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 84, 1-65
- 186- **Organisation Mondiale de la Santé. 1992.** Expert committee on specification for pharmaceuticals preparation. WHO technical report series 823, Report Geneva WHO 32. pp: 44-52, 75-76
- 187- **Organisation Mondiale de la Santé. 1998.** Medicinal plants in the Republic of Korea, WHO Regional Publications, Western Pacific Series No.21.WHO Regional Office for the Western Pacific, Manila
- 188- **Organisation Mondiale de la Santé. 2000.** Severe falciparum malaria, third edition. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and hygiene*, 94, 1-90.
- 189- **Organisation Mondiale de la Santé. 2002.** World Health Report 2002. Reducing risks, promoting healthy life. Geneva: World Health Organization, Geneva.
- 190- **Organisation Mondiale de la Santé. 2001.** Iron Deficiency Anaemia Assessment, Prevention and Control. Geneva World Health Organization.
- 191- **Organisation Mondiale de la Santé. 2008.** The world malaria report 2008. Geneva: World Health Organization; 2008. WHO/HTM/GMP/2008.1.

- 192-** **Organisation Mondiale de la Santé. 2010.** Guidelines for the treatment of malaria. 2 edition. Geneva: World Health Organisation; 2010.
- 193-** **Organisation Mondiale de la Santé. 2011.** Résumé et points essentiels. World Malaria Report 2011.
- 194-** **Organisation Mondiale de la Santé. 2012.** Rapport 2012 sur le paludisme dans le monde.
- 195-** **Ostachowicz, J., Ostachowicz B., Holynska B., Baran W. 1995.** « Application of EDXRF in a survey oof concentration of lead, zinc and Arsenic in soil from selected areas in Krakow, Poland.” *X-Ray Spectrophotometry*, 24, 81-83.
- 196-** **Pasvol, G. 2005.** The treatment of complicated and severe malaria. *Br. Med. Bull.*, 75–76. 29–47.
- 197-** **Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP). 2010.** PNLP/Plan Stratégique National 2011-2015. Aout, 2010.
- 198-** **Poblete, V.H. 1995.** Regional training course for sampling, sample preparation and Data Evaluation for Multielemental and Radionucleide Analysis by Nuclear and Instrumental Methods CCEN, Santiago, 19 pages
- 199-** **Pologe, L. G., Ravetch J. V. 1986.** A chromosomal rearrangement in a *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein gene in associated with the knobless phenotypes. *Nature*, 322, 474-477.
- 200-** **Powell, J.J., Burden T.J., Thompson R.P.H. 1998.** *In vitro* mineral availability from digested tea: a rich dietary source of manganese. *Analyst*, 123, 1721-1724
- 201-** **Pradines B., Dormoia J., Briolanta S., Bogreaua H., Rogiera C. 2010.** La résistance aux antipaludiques. *Revue Francophone des laboratoires*. N° 422.
- 202-** **Price, R.N., Nosten F., Luxemburger C. 1996.** Effects of artemisinin derivates on malaria transmissibility. *Lancet*, 347, 1654-1655
- 203-** **Pukrittayakamee, S., Imwong, M., Looareesuwan, S., White, N.J., 2004.** Therapeutic responses to antimalarial and antibacterial drugs in vivax malaria. *Acta Tropica* 89, 351–356.
- 204-** **Rajurkar, N.S., Damame M.M. 1998.** Mineral Content of Medicinal Plants used in the treatment of diseases resulting from Urinary Tract Disorders. *Appl. Radiat. Isot.*, 49, 773-776.

- 205-** **Ramu, K. and Baker, J.K. 1995.** Synthesis, characterisation, and antimalarial activity of the glucuronides of the hydroxylated metabolites of artéether. *J. Med. Chem.*, 38, 1911-1921.
- 206-** **Räth, K., Taxis K., Walz G., Gleiter C.H., Li S.M., Heide L. 2004.** Pharmacokinetic study of artemisinin after oral intake of a traditional preparation of *Artemisia annua* L. (annual wormwood). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 70, 128-132.
- 207-** **Reed, M.B., Saliba K.J., Caruana S.R., Kirk K., Cowman A.F. 2000.** Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 403, 906-909
- 208-** **Ringwald, P., Sukwa T., Basco L.K., Bloland P., and Mendis K. 2002.** Monitoring of drug-resistant malaria in Africa. *Lancet*, 360, 875-6.
- 209-** **Rooker, S., Guillemaud T., Bergé J., Pasteur N., Raymond M. 1996.** Coamplification of esterase A and B genes as a single unit in *Culex pipiens* mosquitoes. *Heredity*, 77, 555-61.
- 210-** **Sachs, J., Malaney P. 2002.** The economic and social burden of malaria *Nature*, 415, 680-685
- 211-** **Salem, G., Le Gros F. 1994.** Espace urbain et risque anophélien à Pikine (Sénégal). *Cahiers Santé*, 4, 347-357.
- 212-** **Sanchez-Castillo, C.P., Dewey, P.J.S., Aguirre, A., Lara, J.J., Vaca, R., Leon de la Barra, P., Ortiz, M., Escamilla, I., James, W.P.T. 1998.** *J. Food Comp Anal.*, 11, 340-356.
- 213-** **Sauvin, M. 2002.** From ethnopharmacology to laboratory results: does discrepancy mean irrelevancy? Elaboration of pharmacopoeias, pp 172-176
- 214-** **Schwenke, A., Brandts C., Philipps J., Winkler S., Werndorfer W.H., Kremsner P.G. 2001.** Declining chloroquine resistance of *Plasmodium falciparum* in Lambarene, Gabon from 1992 to 1998. *Wien Klin Wochenschr*, 113, 63-64
- 215-** **Schmuck, G., Roehrdanz E., Haynes N.K., and Kahl R. 2002.** Neurotoxic mode of action of artemisinin. *Antimicrob. Agents Chemother*, 46, 821-827

- 216-** **Schroeder, H. 1965.** Influence of Cr, Cd and Pb on rat aortic lipids and circulating cholesterol. *Am. J. Physiol.* 209: 433.
- 217-** **Seck, P. A. 2003.** Etude de la tolérance et de l'efficacité de la quinine diluée, administrée par voie intra rectale dans le traitement du paludisme non compliqué de l'enfant en milieu rural Sénégalais. *Thése Méd.* Dakar. 88 p.
- 218-** **Sharat Singh, N.K., Bino Devi Ch., Sony Singh Th. And Rajmuhon Singh N. 2010.** Trace elements of some selected medicinal plants of Manipur. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 1, 227-231.
- 219-** **Sharma, K.R., Agrawal M., Marshall M.F. 2009.** Heavy metals in vegetables collected from production and market sites of a tropical urban area of India. *Food. Chem. Toxicol.*, 47, 583-591.
- 220-** **Sheded, G.M., Pulford I.D., Hamed I.A. 2006.** Presence of major and trace elements in seven medicinal plants growing in the South-Eastern Desert. *Egypt. J. Arid Env.*, 66, 210-217.
- 221-** **Shen, F.M., Chen H.W. 2008.** Element Composition of Tea Leaves and Tea Infusion and Its Impact on Health. *Bull Environ. Contam. Toxicol.*, 80, 300–304
- 222-** **Shenkin, A., 1998.** Clinical aspects of vitamin and trace element metabolism. *Baillière's Clin. Gastroenter*, 2, 765-798
- 223-** **Siala, E., Khalfaoui M., Bouratbine A., Hamdi S., Hili K., Aoun K., 2005.** Relapse of *Plasmodium malariae* malaria 20 years after living in an endemic area. *Presse Medical* 34, 371–372.
- 224-** **Sidhu, J.S., Ashton M., Huong N.V. 1998.** Artemisinin population pharmacokinetics in children and adults with uncomplicated falciparum malaria. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 45, 347-354
- 225-** **Silachamroon, U., Phumratana Prapin W., Krudsood S., Treeprasertsuk S., Budsaratid V., Pornpininworakij K., Wilairatan P., Looareesuwan S. 2001.** Frequency of early rising parasitaemia in falciparum malaria treated with artemisinin derivates. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 32, 50-6
- 226-** **Smith, S.L., Fishwick J., McLean W.G., and Ward S.A. 1997.** Enhanced in vitro neurotoxicity of artemisinin derivates in the presence of haemin. *Biochem. Pharmacol.*, 53, 5-10

- 227- **Singh, R.B., Gupta U.C., Mittal N., Niaz M.A., Ghosh S. and Rastogi V. 1997.** Epidemiologic study of trace elements and Mg on the risk of coronary artery disease in rural and urban Indian population. *J. Am. Coll. Nut.*, 1, 62-67
- 228- **Singh, V. and Garg A.N. 1997.** Availability of essential trace elements in Ayurvedic Indian Medicinal Herbs using INAA. *Appl. Rad. Isot.*, 48, 97-101.
- 229- **Snow, R.W., Trappe J.F., Marsh K. 2001.** The past, present and future of childhood malaria mortality in Africa. *Trends in Parasitology* 17, 593–597.
- 230- **Somer, E. 1983.** The toxic potential of trace metals in foods: A review. *J. Food Sci.*, 39, 215-217.
- 231- **Sohna, C.S., Molez J.F., Ndiaye P., Sané B., Trape J.F. 1997.** *In vivo* chimiosensitivity tests on *Plasmodium falciparum* to chloroquine in Senegal and the assessment of therapeutic efficacy. *Bull Soc Pathol Exot.*, 90, 83-89
- 232- **Sriram, D., Rao V.S., Chandrasekhara K.V., Yogeeshwari P. 2004.** Progress in the research of artemisinin and its analogues as antimalarials: an update. *Natural Product Research* 18, 503–527
- 233- **Svensson, U.S. and Ashton M. 1999.** Identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the in vitro metabolism of artemisinin. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 48, 528-535
- 234- **Svensson, U.S., Maki-Jouppila M., Hoffmann K.J., Ashton M. 2003.** Characterisation of the human liver *in vitro* metabolic pattern of artemisinin and auto-induction in the rat by use of nonlinear mixed effects modelling. *Biopharm Drug Dispos.*, 24, 71–85.
- 235- **Svensson, U.S.H., Ashton M., Hai T.N. 1998.** Artemisinin induces omeprazole metabolism in human beings. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 64, 160-167
- 236- **Swarthout, T.D., van den Broek I.V., Kayembe G., Montgomery J., Pota H., Roper C. 2006.** Artesunate + amodiaquine and artésunate + sulfadoxine-pyrimethamine for the treatment of uncomplicated malaria in Democratic Republic of Congo: a clinical trial with determination of sulfadoxine and pyrimethamine-resistant haplotypes. *Trop. Med. Int. Health*, 11, 1503-11

- 237- **Talisuna, A.O., Okello P.E., Erhart A., Coosemans M., D'Alessandro U., 2007.** Intensity of malaria transmission and the spread of *Plasmodium falciparum* resistant malaria: a review of epidemiologic field evidence. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 77, 170–180.
- 238- **Tan, T. H., Pach R., Crasaz A., Ivens A., Schneider A. 2002.** tRNAs in *Trypanosoma brucei*; genomic organization, expression, and mitochondrial import. *Mol. Cell. Biol.*, 22, 3707-3717.
- 239- **Tang, W., and Eisenbrand G. 1992.** Chinese Drugs of Plant Origin. Springer-Verlag, Berlin.
- 240- **Tarassov, I. A., Martins. R. P. 1996.** Mechanisms of tRNA import into yeast mitochondria: an overview. *Biochimie*, 78, 502-510.
- 241- **Titulaer, H.A.C., Zuidema J., Kager P.A., Wetsteyn J.C.F.M., Lugt C.H.B. and Markus F.W.H.M. 1990.** The pharmacokinetics of artemisinin after oral, intramuscular and rectal administrationto volunteers. *J. Pharm. Pharmacol.*, 42, 810-813
- 242- **Toure, Y.T., Oduola, A.M., Morel, C.M., 2004.** The *Anopheles gambiae* genome: next steps for malaria vector control. *Trends in Parasitology* 20, 142–149
- 243- **Trampuz, A., Jereb M., Muzlovic I., Prabhu R.M., 2003.** Clinical review: Severe malaria. *Critical Care*, 7, 315–323
- 244- **Trape, J. F. 1986.** Impact de l'urbanisation sur le paludisme. *Thése de doctorat ès Sciences Naturelle* Université de Paris Sud. 412 p.
- 245- **Trape, J. F., Diagne N., Rogier C., Ndiaye P., Bouganalli H., Badji A., Tall A., Ndiaye G. 1994.** The Dielmo project: a longitudinal study of natural malaria infection and the mechanisms of protective immunity in a community living in a holoendemic area of Senegal. *Am J. Trop. Med. Hyg.*, 51, 123-127.
- 246- **Trape, J. F., Ndiaye P., Konaté L., Bah I. B., Diallo S., Verdier F., Hatin I., Le Bras J. 1989.** Chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Senegal. *Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 83, 761-7
- 247- **Turnlund, J.R. 1999.** Copper. In: Shils, M.E., J.A. Olson, M. Shike, A.C. Ross, (Eds.), *Moder Nutrition in Health and Disease*. 9th Edn. Williams & Wilkins, Baltimore, pp: 241-252.

- 248-** **Valecha, N., Biswas S., Badoni V., Bhandari K.S., and Sati O.P. 1994.** Antimalarial activity of *Artemisia japonica*, *Artemisia maritima* and *Artemisia nilegarica*. *Indian J. Pharmacol.*, 26, 144-146
- 249-** **Van Agtmael, M.A., Eggelte T.A., and van Boxtel C.J. 1999.** Artemisinin drugs in the treatment of malaria from medicinal herb to registered medication. *Trends Pharmacol. Sci.*, 20, 199-205
- 250-** **Verhaeghen, K., Van Bortel W., Roelants P., Backeljau T., Coosemans M. 2006.** Detection of the East and West African kdr mutation in *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis* from Uganda using a new assay based on FRET/Melt Curve analysis. *Malaria Journal*, 5, 16.
- 251-** **Vincze, L., Jansens K., Adam F. 1993.** A general Monte Carlo simulation of Energy-Dispersive X-Ray fluorescence spectrometers-I : Unpolarized radiation, homogeneous samples. *Spectrochim Acta* 48B, 553.
- 252-** **Vries (de), P.J. Tran K.D. Nguyen X.K. Le Nguyen, Pham T.Y., Dao D.D., Boxtel (van) C.J., Kager P.A. 1997.** The pharmacokinetics of a single dose of artemisinin in patients with uncomplicated falciparum malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 56, 503-507
- 253-** **Walker, C.F., Kordas K., Stoltzfus R.J., Black R.E. 2005.** Interactive effects of iron and zinc on biochemical and functional outcomes in supplementation trials. *Am. J. Clin. Nutr.* 82, 5-12.
- 254-** **Wang, X., Mu J., Li G., Chen P., Guo X., Fu L., Chen L., Su X., Wellems T.W. 2005.** Decreased prevalence of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter 76T marker associated with cessation of chloroquine use against *P. falciparum* malaria in Hainan, People's Republic of China. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 72, 410-414
- 255-** **Weill, M., Malcolm C., Chandre F., Mogensen K., Berthomieu A., Marquine M. 2004.** The unique mutation in ace-1 giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect. Mol. Biol.* 13, 1-7.
- 256-** **White, N.J. 1998.** Why is that antimalarial drug treatments do not always work? *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 92, 449-458
- 257-** **White, N.J. 1999.** Antimalarial drug resistance and combination chemotherapy. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, 354, 739-749.
- 258-** **White, N.J. 2008.** Qinghaosu (artemisinin): the price of success. *Science*, 320, 330-334.

- 259-** **White, T.E., Bushdid P.B., Ritter S., Laffan S.B., Clark R.L. 2006.** Artesunate-induced depletion of embryonic erythroblasts precedes embryolethality and teratogenicity *in vivo*. *Birth. Defects. Res.*, 77, 413–429.
- 260-** **Whittaker, P. 1998.** Iron and zinc interactions in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, 68, 442S–446S.
- 261-** **Willcox, M. 2009.** Artemisia species: from traditional medicines to modern antimalarials-and back again. *J. Alternative & Complementary Medicine*, 15, 101-109
- 262-** **Willcox, M., Bodeker G., Rasoanaivo P. 2004.** Traditional Medicinal Plants and Malaria. *CRC PRESS*. 552 pages.
- 263-** **Willcox, M., and Rasoanaivo P. 2004.** Comment on: Randomized controlled trial of a traditional preparation of *Artemisia annua* L. (Annual Wormwood) in the treatment of malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 98, 755-6
- 264-** **Willcox, M.L., Graz B., Diakite C., Falquet J., Dackouo F., Sidibe O., Giani S., Diallo D. 2011.** Is parasite clearance clinically important after malaria treatment in a high transmission area? A 3-month follow-up of home-based management with herbal medicine or ACT. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 105, 23-31.
- 265-** **Wilson, R. J., Denny P. W., Presier P. R., Rangachari K., Roberts K., Roy A., Whyte A., Strath M., Moore P.W., Williamson D. H. 1996.** Complete gene map of the plastid-like DNA of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J. Mol. Biol.*, 261, 155-172.
- 266-** **Wirth, M.C., Marquine M., Georghiou G.P., Pasteur N. 1990.** Esterases A2 and B2 in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae): role in organophosphate resistance and linkage. *J Med Entomol*, 27, 202-6.
- 267-** **Wong, M.K., Tan P., Wee Y.C. 1993.** Heavy metals in some of Chinese herbal plants. *Biol. Trace Elem. Res.*, 36, 135-142.
- 268-** **Wong, M.H., Zhang Z.Q., Wong J.W.C., Lan C.Y. 1998.** Trace metal contents (Al, Cu et Zn) of tea: tea and soil from two teas plantations and tea products from different provinces of China. *Environ Geochem. Health*, 20, 87-94
- 269-** **Woodrow, CJ, Haynes RK, Krishna S. 2005.** Artemisinins. *Postgrad Med. J.*, 81, 71–78.

- 270- **Wright, C.W., Linley P.A., Brun R., Wittlin S., Hsu E. 2010.** Ancient Chinese Methods Are Remarkably Effective for the Preparation of Artemisinin-Rich Extracts Qing Hao with Potent Antimalarial Activity. *Molecules*, 15, 804-812.
- 271- **Yang, Y.Z., Ranz A., Pan H.Z., Zhang Z.N., Lin X.B., Meshnick S.R. 1992.** Daphnetin: a novel antimalarial agent with *in vitro* and *in vivo* activity. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46, 15-20.
- 272- **Ye, X.S., Cheng D.X., and Wang Y.Q. 1982.** Effect of Qinghaosu on macrophage phagocytosis in the mouse abdominal cavity. *J. Beijing Med. Coll.*, 14, 141-142
- 273- **Yu, H. and Zhong S. 2002.** Artemisia in Chinese medicine. In *Artemisia*, Wright, C.W., Ed. Taylor & Francis, London
- 274- **Zhou, C.Y., Wu J., Chi H., Wong M.K., Kho L.L., Wee Y.C. 1996.** The behaviour of leached aluminium in tea infusions. *Sci. Total Environ.*, 177, 9-16.
- 275- **Zirihi, G.N., Mambu L., Gu'ed'e-Guina F., Bodo B., Grellier P. 2005.** *In vitro* antiplasmodial and cytotoxicity of 33 West African plants used for treatment of malaria. *Journal of Ethnopharmacology*, 98, 281–285.
- 276- **Zuegge, J., Ralph S., Schmuker M., McFadden G. I. and Schneider S. 2001.** Deciphering apicoplast targeting signals-feature extraction from nuclear-encoded precursors of *Plasmodium falciparum* apicoplast proteins, 280-287.

Titre : Chimiosensibilité *ex vivo* des souches de *Plasmodium falciparum* à la tisane d'*Artemisia annua* et caractérisation des éléments minéraux des feuilles de la plante

Résumé : Au Sénégal, depuis quelques années, différentes méthodes d'interventions et de lutte contre le paludisme sont mises en place : l'introduction du Traitement Préventif Intermittent (TPI) en 2003, des Combinaisons de Traitement à Base d'Artémisinine (Artemisinin Combinaison Traitement, ACT) en 2005, les Tests de Diagnostic Rapides (TDR) en 2008, la couverture universelle en moustiquaires imprégnées en mars –avril 2013 et tout récemment, en octobre, la chimioprévention saisonnière chez les enfants de moins de 10 ans. La mise en œuvre de ces plans stratégiques a permis de réduire considérablement la morbidité et la mortalité liées au paludisme. Cependant, malgré cette réduction, le paludisme demeure toujours un problème de santé publique. Cette situation est causée en partie par la résistance des parasites aux traitements antipaludiques. Ainsi, un traitement efficace, moins onéreux, accessible à toutes les franges de la population, serait une aubaine. *L'A. annua*, utilisé dans le traitement de la malaria, se présente comme une alternative. Pour vérifier cette activité antipaludique nous nous sommes fixés comme objectifs d'évaluer la chimiosensibilité des souches de *Plasmodium falciparum* à la tisane d'*A. annua* et d'analyser la composition et déterminer la non présence de concentrations toxiques d'éléments minéraux dans les feuilles de cette plante. L'étude s'est déroulée sur 40 échantillons collectés à Pikine en 2010, analysés par la technique du DELI et 45 échantillons collectés à Thiès en 2011, analysés par la technique du DAPI. Tous ces échantillons sont collectés chez des patients atteints de paludisme simple. La méthode du LIBS nous a permis d'analyser les concentrations d'éléments minéraux contenues dans les feuilles d'*A. annua*. Les résultats obtenus avec le DELI ont montré une IC_{50} moyenne égale à 0,095 µg/ml. 90% des échantillons ont des IC_{50} inférieures à 0,5 µg/ml, 2,5% ont une IC_{50} supérieure à 0,5 µg/ml et 7,5% ont donné des résultats ininterprétables. Concernant les souches de références 3D7 et W₂, des IC_{50} de 0,146 µg/ml et 0,394 µg/ml respectives ont été observées. Les résultats obtenus avec le DAPI ont montré une moyenne de IC_{50} égale à 1,034 µg/ml. D'après Sauvin (2002) 41 échantillons (91,11%) ont des IC_{50} inférieures à 5 µg/ml, un (1) seul (2,22%) a une IC_{50} supérieure à 5 µg/ml et trois (3) échantillons (6,67%) seulement ont donné des résultats ininterprétables. Si on se réfère à Malebo et al, 2009, 15 échantillons (33,33%) ont des IC_{50} < 0,5 µg/ml, 25 échantillons (55,55%) ont des IC_{50} comprises entre 0,5 µg/ml et 5 µg/ml et un seul (2,22%) a une IC_{50} > 5 µg/ml. Quelque soit l'auteur (Sauvin et Malebo), les résultats obtenus ont montré une bonne activité antipaludique de notre tisane d'*A. annua*. Concernant les souches de références que sont 3D7 et W₂, des IC_{50} de 1,040 µg/ml et 1,394 µg/ml respectives ont été observées. Les résultats du LIBS ont montré que les feuilles d'*A. annua* contiennent différentes concentrations de macroéléments et microéléments (K, Mg, Ca, P, S, Fe, Mn, Cu, Zn) indispensables et importants pour l'organisme et n'avaient aucune concentration d'éléments minéraux supérieure aux normes admises par l'OMS pour les plantes médicinales. Ces résultats obtenus, par ces deux techniques nous permettent d'affirmer la propriété inhibitrice de la tisane d'*A. annua* sur les souches de Pikine et de Thiès *ex vivo*. Ceux obtenus sur les éléments minéraux, prouvent la non toxicité de cette tisane et la présence d'éléments indispensables dont l'apport est très important à l'organisme, viennent conforter la possibilité d'entreprendre une étude pour confirmer *in vivo*, l'activité antiplasmodiale de cette tisane sur le *P. falciparum*.

Mots clés : *Artemisia annua*, DELI, *Plasmodium falciparum*, IC50, DAPI, LIBS

Title: Chemosensitivity of *Plasmodium falciparum* strains on *Artemisia annua* tea and characterization of element and mineral content in *Artemisia annua*

Summary: In Senegal, the last few years, different methods of interventions and fight against malaria are implemented: the introduction of Intermittent Preventive Treatment (IPT) in 2003, Artemisinin Combinations Treatment (ACT) in 2005, Quick Diagnostic Tests in 2008, universal ITN coverage in March-April 2013 and most recently in October, seasonal chemoprophylaxis in children under 10 years. The implementation of these strategic plans has significantly reduced morbidity and mortality due to malaria. However, despite this reduction, malaria remains a public health problem. This is partly caused by the parasite resistance to antimalarial treatments. Thus, effective treatment, less expensive, accessible to all segments of the population, would be a boon. *Artemisia annua*, used in the treatment of malaria, presents itself as an alternative. To verify this antimalarial activity we set as goals to assess the chemosensitivity of *P. falciparum* strains on *A. annua* tea and analyze the composition and determine the presence of non-toxic concentrations of mineral elements in the leaves of this plant. The study was conducted on 40 samples collected in Pikine in 2010, analyzed by DELI test and 45 samples collected in Thiès in 2011, analyzed by DAPI test. All these samples were collected from patients with uncomplicated malaria. The LIBS method allowed us to analyze the concentrations of mineral elements contained in the leaves of *Artemisia annua*. The results obtained by DELI test showed average IC_{50} equal to 0.095 µg / ml. 90% of the samples were below 0.5 µg / ml IC_{50} , 2.5% have an IC_{50} greater than 0.5 µg / ml and only 7.5% gave none interpretable results. Regarding the reference strains 3D7 and W₂, IC_{50} of 0.146 µg / ml and 0.394 µg / ml respectively were observed. Results obtained by DAPI test showed a value IC_{50} of 1.034 µg / ml. According Sauvin (2002) 41 samples (91.11%) have less than 5 µg / ml IC_{50} , a one (1) (2.22%) has an IC_{50} greater than 5 µg / ml and only three (3) samples (6.67%) gave none interpretable results. Referring to Malebo et al, 2009, 15 samples (33.33%) have IC_{50} < 0.5 µg / ml, 25 samples (55.55%) have IC_{50} between 0.5 µg / ml and 5 µg / ml and one (1) (2.22%) has an IC_{50} > 5 µg / ml. Be the author (Sauvin and Malebo), the results showed good antimalarial activity of our tea *A. annua*. Regarding the reference strains 3D7 and W₂, IC_{50} of 1.040 µg / ml and 1.394 µg / ml respectively were observed. The results obtained by LIBS showed that *A. annua* leaves contain different concentrations of macroelements and microelements (K, Mg, Ca, P, S, Fe, Mn, Cu, Zn) essential and important for the organism and had no concentration of minerals higher than the standards accepted by the WHO in medicinal plants. These results obtained by these two techniques allow us to affirm *ex vivo* inhibitory property of the *A. annua* tea on Pikine and Thies strains. Those obtained on the mineral elements, demonstrate the non-toxicity of this tea and the presence of essential elements whose contribution is very important for the organism, and clearly reinforce the possibility of undertaking a study to confirm *in vivo* antiplasmodial activity of this tea on *P. falciparum*.

Keys words: *Artemisia annua*, DELI, *Plasmodium falciparum*, IC50, DAPI, LIBS