



Mémoire de fin d'études

**Mise en place et optimisation d'un protocole de quantification de la bêta-hématine dans le cadre de l'évaluation mécanistique de composés à potentiel anti-plasmodial**

Présenté par : **Charlotte QUINTART**

En vue de l'obtention du grade de Master en Sciences Pharmaceutiques.

<b>Promoteur :</b>	Professeur Bertrand Blankert	UMons
Co-promoteur éventuel	PhD Mathilde Wells	UMons
<b>Jury</b>	Professeur Gilles Berger	ULB
	Professeur Pierre Duez	UMons

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de mon stage de recherche et qui m'ont aidée lors de la rédaction de ce mémoire.

Je voudrais dans un premier temps remercier, mon promoteur de mémoire, Monsieur le Professeur Blankert (Laboratoire d'Analyse Pharmaceutique) pour la confiance qu'il m'a accordée et surtout pour ses judicieux conseils scientifiques qui ont contribué à alimenter ma réflexion ainsi que Madame Wells (Laboratoire d'Analyse Pharmaceutique) qui a partagé ses connaissances et expériences dans ce milieu, tout en m'accordant une large indépendance dans l'exécution de missions valorisantes.

Je leur témoigne aussi toute ma gratitude pour avoir relu et corrigé mon mémoire. Leurs conseils de rédaction ont été très précieux.

Je remercie également toute l'équipe pédagogique des Bacheliers et Masters en Pharmacie de l'Université de Mons ainsi que les intervenants professionnels responsables de ma formation, pour avoir assuré la partie théorique de celle-ci.

Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance aux personnes suivantes, pour leur aide dans la réalisation de ce mémoire :

Monsieur le Professeur Duez (Service de Chimie Thérapeutique et Pharmacognosie) qui m'a conseillée lors de l'utilisation de l'HPLC et son assistante, Madame Carette qui m'a accompagnée et formée pour la technique de microscopie électronique SEM,

Monsieur le Professeur Vanderbist et son assistant, Monsieur Malfroy (Service de Pharmacie Galénique) qui m'ont beaucoup appris sur la micronisation d'une poudre et m'ont orientée vers le site Drug Bank pour la solubilité des échantillons,

Monsieur le Professeur Berger (Service du Doyen) qui m'a orientée pour la réalisation de la bibliographie,

Madame Gariffo Sarah, doctorante (Service de Chimie Générale, Chimie Organique, Biomédicale-Madame le Professeur Laurent) pour sa très grande disponibilité et ses explications précieuses au sujet de la FT-IR et la DLS,

Monsieur Puozzo, premier agent spécialisé principal (Laboratoire de Biologie des Organismes Marins et Biomimétisme) qui m'a aidée pour la récupération de mes résultats,

Monsieur Palmieri, technicien (Service de Chimie Thérapeutique et Pharmacognosie) qui m'a donné accès à l'étuve et a veillé au bon fonctionnement de celle-ci,

Tous ceux avec qui j'ai eu la chance de travailler et qui ont créé une excellente ambiance de travail,

Mes parents, pour leur soutien constant et leurs encouragements.

## RESUMÉ

La malaria est la première maladie endémique parasitaire mondiale, responsable de nombreux décès suite à la résistance aux traitements, à la résistance des moustiques *Anopheles* aux insecticides et à une inaccessibilité aux soins de santé.

Cette maladie est provoquée par un parasite du genre *Plasmodium*. Au sein des érythrocytes de l'hôte humain, les parasites, sous forme de mérozoïtes, dégraderont l'hémoglobine pour en utiliser les acides aminés. L'hème produit par cette dégradation, toxique pour les mérozoïtes, sera détoxifié par ceux-ci en hémozoïne ou pigment malarique.

Afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques, des chercheurs étudient différentes caractéristiques de l'hémozoïne car cette dernière pourrait représenter le point faible du parasite.

Ce travail de recherche a permis la mise en place et l'optimisation d'un protocole de quantification de la bêta-hématine ( analogue synthétique de l'hémozoïne ) en HPLC-VIS.

Les échantillons de bêta-hématine synthétisée à partir d'hémine, ont été identifiés et caractérisés.

Des tests de solubilisation de cette bêta-hématine synthétisée ont par la suite été effectués pour permettre d'injecter la solution en HPLC-VIS et ainsi quantifier la bêta-hématine présente.

Au terme de ce travail, nous obtenons deux droites de calibration ( $R^2=0,9955$  et  $R^2 = 0,9973$ ) d'échantillons de bêta-hématine (de 0,01  $\mu\text{g/mL}$ , à 150  $\mu\text{g/mL}$ ), superposables. Nous pouvons conclure qu'il est possible de quantifier la bêta-hématine, après solubilisation, en HPLC-VIS.

Cette méthode de quantification de la bêta-hématine en HPLC-VIS permettra secondairement à d'autres intervenants de tester *in vitro* l'efficacité de leurs composés, molécules anti-malariques sur l'inhibition de la synthèse de la bêta-hématine.

## **ABSTRACT**

Malaria is the world's leading parasitic endemic disease, responsible for many deaths due to resistance to treatment, resistance of *Anopheles* mosquitoes to insecticides and inaccessibility to health care.

The disease is caused by a parasite of the genus *Plasmodium*. Within the erythrocytes of the human host, the parasites, in the form of merozoites, will break down haemoglobin to use its amino acids. The heme produced by this degradation, which is toxic to the merozoites, will be detoxified by them into haemozoin or malaric pigment.

In order to develop new therapeutic strategies, researchers are studying different characteristics of haemozoin, as this could represent the parasite's weak point.

This research work has led to the implementation and optimisation of a protocol for the quantification of beta-haematin (a synthetic analogue of haemozoin ) using HPLC-VIS.

Samples of beta-haematin synthesized from hemin were identified and characterized.

Solubilization tests of this synthesized beta-haematin were then carried out to allow the solution to be injected into HPLC-VIS and thus quantify the beta-haematin present.

At the end of this work, we obtained two calibration lines ( $R^2=0.9955$  and  $R^2 = 0.9973$ ) of beta-haematin samples (from  $0.01 \mu\text{g/mL}$  to  $150 \mu\text{g/mL}$ ), which are superimposable. It can be concluded that it is possible to quantify beta-haematin, after solubilization, in HPLC-VIS.

This method of quantifying beta-haematin in HPLC-VIS will allow other parties to test *in vitro* the effectiveness of their compounds, anti-malarial molecules on the inhibition of beta-haematin synthesis.

## Table des matières

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>1</b>
<b>RESUMÉ .....</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>4</b>
<b>1. MISE AU POINT BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>9</b>
<b>1.1. MALARIA – GÉNÉRALITÉS .....</b>	<b>9</b>
1.1.1 DÉFINITION .....	9
1.1.2 CYCLE BIOLOGIQUE DU PARASITE .....	10
1.1.3 VECTEUR ET TRANSMISSION DE LA MALADIE .....	15
1.1.4 CLINIQUE ET PHYSIOPATHOLOGIE .....	18
1.1.5 DIAGNOSTIC .....	19
1.1.6 PRÉVENTIONS ET TRAITEMENTS .....	21
<b>1.2. HÉMOZOÏNE .....</b>	<b>23</b>
1.2.1 DÉFINITION .....	23
1.2.2 VOIES DE SYNTHÈSE <i>IN VIVO</i> .....	26
1.2.3 CARACTÉRISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES .....	27
<b>1.3. DÉCOUVERTE DE NOUVEAUX AGENTS ANTI-MALARIQUES À PARTIR DE SOURCES NATURELLES .....</b>	<b>31</b>
<b>2. OBJECTIFS .....</b>	<b>32</b>
<b>3. PARTIE EXPÉRIMENTALE .....</b>	<b>33</b>
<b>3.1. MATÉRIEL ET MÉTHODES .....</b>	<b>33</b>
3.1.1 RÉACTIFS CHIMIQUES, INSTRUMENTS DE MESURE .....	33
3.1.2 SYNTHÈSE BÊTA-HÉMATINE .....	34
3.1.3 CARACTÉRISATION .....	35
3.1.4 DÉVELOPPEMENT LC-VIS .....	38
<b>3.2. RÉSULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>44</b>
3.2.1 SYNTHÈSE DE LA BÊTA-HÉMATINE .....	44
3.2.2 CARACTÉRISATION .....	45
3.2.3 TESTS DE SOLUBILISATION DE LA BÊTA-HÉMATINE .....	51
3.2.4 LC-VIS .....	52
<b>4 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>61</b>
<b>5 BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>64</b>
<b>ANNEXE .....</b>	<b>73</b>

## Liste des figures

<b>Figure 1</b>	<i>Parcours des sporozoïtes à partir de la piqûre du moustique jusqu'aux cellules hépatocytaires.[13]</i>	<i>p.12</i>
<b>Figure 2</b>	<i>Exemple de formation d'une jonction mobile entre AMA1 sécrété par un mérozoïte avec la boucle C-terminale de RON2 du complexe macromoléculaire au niveau de la membrane de la cellule hôte (érythrocyte). [14]</i>	<i>p.13</i>
<b>Figure 3</b>	<i>. Le cycle de vie du Plasmodium. Le cycle implique deux hôtes: un moustique Anopheles femelle et un être humain. [8]</i>	<i>p.15</i>
<b>Figure 4</b>	<i>Schéma reprenant les réactions responsables de la dégradation de l'hémoglobine, de la formation d'hémozoïne et de la formation des acides aminés. L'hémozoïne est issue de la polymérisation des groupements héminiques. [40]</i>	<i>p.24</i>
<b>Figure 5</b>	<i>Voies de détoxification de l'hème chez Plasmodium. Voie (1) Cristallisation de l'hème en hémozoïne; Voie (2) Dégradation peroxydative de l'hème; Voie (3) Dégradation de l'hème par l'intermédiaire du Gluthation; Voie (4) Dégradation enzymatique de l'hème en bilirubine. Les deux dernières voies nécessitent le passage de l'hème libre de la vacuole digestive vers le cytosol du parasite. [43]</i>	<i>p.25</i>
<b>Figure 6</b>	<i>Les différentes structures chimiques des composés d'hème. A :hémine B :hématine C :hémozoïne/bêta-hématine. [3]</i>	<i>p.28</i>
<b>Figure 7</b>	<i>Spectre IR de la bêta-hématine synthétisée à partir du protocole numéro 1 (A), de la bêta-hématine synthétisée à partir du protocole numéro 2 (B), de l'hématine porcine (C), de l'hémine (D).</i>	<i>p.46</i>
<b>Figure 8</b>	<i>Images à haute résolution des porphyrines. A : Bêta-hématine protocole 1. Taille : 250µm- 167µm B : Bêta-hématine protocole 2. Taille : 250µm- 200µm B-bis : Autre image plus nette de la bêta-hématine protocole 2. C : Hématine porcine. Taille : 267µm-175µm C-bis : Autre image de l'hématine porcine. D : Hémine. Taille : 50µm-17µm</i>	<i>p.48</i>
<b>Figure 9</b>	<i>DLS de la bêta-hématine 0,25 mg/mL issue du protocole n°1. Taille hydrodynamique : 282,6 nm, (282,6 ± 4,160 ) nm. Atténuateur :4. PDI :0,261. 3 runs reproductibles.</i>	<i>p.50</i>
<b>Figure 10</b>	<i>Chromatogramme en HPLC-VIS d'une solution stock de bêta-hématine diluée dans du méthanol afin d'obtenir une concentration finale de 250 µg/mL. Échantillon injecté à une longueur d'onde (λ) de 395 nm selon le protocole décrit dans matériel et méthodes (cfr 3.1.4)</i>	<i>p.53</i>
<b>Figure 11</b>	<i>Chromatogramme en HPLC-VIS d'une solution stock de bêta-hématine (a), d'hémine (b) ou d'hématine (c), chacune diluée dans du méthanol afin d'obtenir une concentration finale de 100 µg/mL. Échantillon injecté à une longueur d'onde (λ) de 395 nm selon le protocole décrit dans matériel et méthodes (cfr 3.1.4). Temps de rétention entre 20 et 25 minutes.</i>	<i>p.54</i>
<b>Figure 12</b>	<i>Superposition des chromatogrammes de solutions stock de bêta-hématine anciennement synthétisée par Traore O.(a), de bêta-hématine (b), d'hématine porcine (c), d'hémine (d), chacune diluée</i>	<i>p.56</i>

	<i>dans du méthanol afin d'obtenir une concentration finale de 100 µg/mL. Échantillons préparés et injectés à une longueur d'onde (<math>\lambda</math>) de 395 nm selon le protocole décrit dans matériel et méthodes (cfr 3.1.4). Temps de rétention : 28 minutes pour la <i>bêta-hématine (b)</i>, 29 minutes pour la <i>bêta-hématine anciennement synthétisée (a)</i>, 29 minutes pour l'<i>hématine porcine (c)</i> et 29 minutes pour l'<i>hémine (d)</i>.</i>	
<b>Figure 13</b>	<i>Superposition des chromatogrammes de solutions stock de <i>bêta-hématine anciennement synthétisée par Traore O. (a)</i>, de <i>bêta-hématine (b)</i>, d'<i>hématine porcine (c)</i>, d'<i>hémine (d)</i>, chacune diluée dans du méthanol afin d'obtenir une concentration finale de 100 µg/mL. Échantillons préparés et injectés à une longueur d'onde (<math>\lambda</math>) de 395 nm selon le protocole décrit dans matériel et méthodes (cfr 3.1.4). Temps de rétention : 29 minutes pour la <i>bêta-hématine (b)</i>, 29 minutes pour la <i>bêta-hématine anciennement synthétisée (a)</i>, 29 minutes pour l'<i>hématine porcine (c)</i> et 29 minutes pour l'<i>hémine (d)</i></i>	p.57
<b>Figure 14</b>	<i>Superposition des chromatogrammes du blanc numéro un (b) qui est le blanc injecté après l'injection de bêta-hématine 100µg/mL et du blanc numéro quatre (a) qui est le dernier blanc à être injecté. Le carry-over a fortement diminué au quatrième blanc.</i>	p.58
<b>Figure 15</b>	<i>Superposition des chromatogrammes du blanc numéro quatre (a) qui est le dernier blanc injecté en mode isocratique et du blanc numéro cinq (b) qui est le blanc injecté en mode gradient. Un pic au cinquième blanc réapparaît.</i>	p.59
<b>Figure 16</b>	<i>Droites de calibration d'échantillons de la bêta-hématine de 0,01 µg/mL, à 150 µg/mL.</i>	p.60

### Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b>	<i>Ce tableau reprend les différentes méthodes utilisées afin de détecter la présence des différentes espèces de Plasmodium. Ce tableau est issu et traduit en français à partir de [27].</i>	p.20
<b>Tableau 2</b>	<i>Tableau reprenant la phase mobile (solvants A et B) injectée en gradient.</i>	p.42
<b>Tableau 3</b>	<i>Tableau reprenant la phase mobile (solvants A et B) injectée en gradient.</i>	p.43
<b>Tableau 4</b>	<i>Tableau reprenant les rendements en bêta-hématine obtenus lors de la réalisation du protocole 1. Le rendement en bêta-hématine est de <math>(44 \pm 2)\%</math>.</i>	p.44
<b>Tableau 5</b>	<i>Tableau reprenant les rendements en bêta-hématine obtenus lors de la réalisation du protocole 2. Le rendement en bêta-hématine est de <math>(60 \pm 4)\%</math>.</i>	p.45
<b>Tableau 6</b>	<i>Étude de la précipitation de différents échantillons de concentrations croissantes (solution stock de bêta-hématine diluée dans du méthanol ou de l'eau Mili-Q) dans différents solvants ou mélanges de solvants (phase mobile) à volume égal.</i>  <i>NP – Aucune précipitation.</i>	p.52

## Liste des annexes

<b>Annexe 1</b>	<i>Images à haute résolution des porphyrines. A : Bêta-hématine protocole 1 métallisée. B : Bêta-hématine protocole 2 métallisée. C : Bêta-hématine synthétisée par Traore.O métallisée. D : Hématine porcine métallisée. E : Hémine métallisée.</i>	p.73
-----------------	--	------

## Liste des abréviations

<b>CSP</b>	Protéine circumsporozoïte
<b>AMPK</b>	AMP- activated protein kinase
<b>MST</b>	Protéine de surface du merozoïte
<b>HSPG</b>	Heparan sulfate protéoglycanes
<b>GR</b>	Globule rouge
<b>SPECT</b>	«Sporozoite Protein Essential for Cell Transversal»
<b>CelTos</b>	«Cell Traversal protein for Ookinetes and Sporozoïtes»
<b>MACPF</b>	« Membrane Attack Complex/Perforin »
<b>TIE</b>	Taux annuel d'inoculation entomologique
<b>AC</b>	Anticorps
<b>TDRs</b>	Les tests rapides diagnostiques
<b>HRP-2</b>	Histidine-rich protein
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction
<b>IFA</b>	Immunofluorescence
<b>IA</b>	<i>Incilius alvarius</i>
<b>RM</b>	<i>Rhinella marina</i>
<b>IR</b>	Infra-rouge
<b>FTIR</b>	Fourier-Transform Infrared spectroscopy
<b>SEM</b>	Spectroscopy Electron Microscopy
<b>DLS</b>	Dynamic Light Scattering
<b>MS</b>	Mass Spectrometry
<b>LC-UV</b>	Liquid Chromatography With Ultraviolet Detection
<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Chromatography
<b>TFA</b>	Acide trifluoroacétique
<b>ACN</b>	Acétonitrile

## 1. Mise au point bibliographique

### 1.1. Malaria – Généralités

#### 1.1.1 Définition

La malaria est la première maladie endémique parasitaire mondiale qui provoque, chaque année de nombreux décès. Depuis les années 2000 jusqu'en 2019, le nombre de personnes infectées a fortement diminué ainsi que les décès dus à cette maladie. Cependant, une augmentation des cas de malaria et de décès suite à la contraction de cette maladie est observée en 2020.

En 2020, on recense 240 millions de personnes infectées dont 627 000 décès; ceci représente environ 69 000 personnes décédées de plus qu'en 2019. [1]

Plusieurs causes telles que la résistance aux traitements, la résistance des moustiques *Anopheles* aux insecticides, une inaccessibilité ou une rupture de l'accès aux soins de santé, pourraient expliquer cette augmentation de cas. De plus, l'OMS a remarqué que les pics de transmission coïncidaient avec la pandémie de Covid. En effet, lors de cette crise, les consultations ainsi que les dépistages de malaria ont fortement diminué. [2,3]

L'OMS indique que 95% des cas de malaria et 96% des décès à la suite de la contraction de la malaria se situent en Afrique. [1]

Sur ce continent, 80% des décès concernent des enfants de moins de 5 ans. [1]

Les personnes les plus touchées par cette maladie, outre les enfants de moins de 5 ans, sont les personnes présentant une faible immunité telles que les femmes enceintes. [1]

Tous ces cas de malaria sont essentiellement le fait d'un protozoaire du genre *Plasmodium* dont l'espèce la plus prévalente et associée au taux de mortalité le plus élevé est *Plasmodium falciparum*; *Plasmodium vivax* étant l'espèce la plus étendue géographiquement.

Il existe des centaines d'espèces appartenant au genre *Plasmodium* qui peuvent infecter de nombreuses espèces animales dont les mammifères. [4] Cependant, parmi ces centaines d'espèces, seulement six vont être capables d'infecter les humains: le *Plasmodium falciparum*, le *Plasmodium vivax*, le *Plasmodium ovale wallickeri*, le *Plasmodium ovale curtisi*, le *Plasmodium malariae*, le *Plasmodium knowlesi*. [5]

Les symptômes causés chez l'Homme par le parasite dépendent de l'espèce.

On retrouvera ces différentes espèces dans des zones géographiques parfois très différentes. La malaria est transmise dans les zones tropicales et subtropicales et spécifiquement en Afrique. Certaines conditions climatiques doivent être rencontrées afin de permettre d'une part la survie et la multiplication des moustiques *Anopheles* et d'autre part, permettre la réalisation du cycle biologique du parasite chez le moustique. La température ambiante est une condition essentielle

à la transmission de la malaria; le taux d'humidité ambiante ou la quantité de précipitations ont également un rôle dans la transmission de la malaria.

L'Afrique est dominée par le *Plasmodium falciparum*, le *Plasmodium malariae* et le *Plasmodium ovale*. *Plasmodium vivax* est peu implanté en Afrique (corne est de l'Afrique). En Inde, c'est surtout le *Plasmodium vivax* qui domine alors qu'en Amérique latine et en Asie du sud-est, on y retrouve essentiellement le *Plasmodium falciparum* et le *Plasmodium vivax*. [3] [4] [6] *Plasmodium knowlesi* ne doit pas être sous-estimé. Initialement découverte chez certaines espèces de macaques, l'espèce est impliquée dans l'émergence de formes graves de la malaria chez l'Homme en Asie du Sud-Est (zoonose). [7] Il est important de la diagnostiquer rapidement, étant donné son taux de réplication rapide et un niveau consécutif élevé de parasitémie chez la personne infectée. *Plasmodium knowlesi* est souvent confondue avec *Plasmodium malariae*, forme de malaria humaine plus bénigne, de par leur morphologie similaire en microscopie.[3]

### 1.1.2 Cycle biologique du parasite

Le cycle de vie du *Plasmodium* est divisé en deux étapes. Il se passe entre deux hôtes. Ces deux hôtes, l'Homme et le moustique *Anopheles* femelle, sont indispensables afin de permettre le développement, la croissance et la reproduction du parasite. [8]

Le *Plasmodium* infectant les humains se reproduit de façon asexuée chez l'Homme alors que sa reproduction sexuée a lieu chez le moustique *Anopheles*.

Le parasite est transmis à l'Homme sous forme de sporozoïtes à partir des glandes salivaires du moustique *Anopheles* lorsque celui-ci prend son repas en sondant la peau à la recherche d'un vaisseau sanguin.[9] En effet, les sporozoïtes stockés dans les glandes salivaires du moustique sont libérés et déposés au niveau du derme humain lorsque le moustique éjecte sa salive. Les sporozoïtes inoculés au niveau du derme vont traverser rapidement les cellules dermiques avant d'entrer dans les vaisseaux sanguins ou d'être drainés par les vaisseaux lymphatiques dans les ganglions où les sporozoïtes risquent d'être exposés aux cellules dendritiques, induisant la réponse immunitaire protectrice des cellules T. [10]

Les sporozoïtes se déplacent à travers le derme à une vitesse d'1 à 2  $\mu\text{m}$ /seconde par mobilité par migration [11,12,13]

Une fois dans la circulation sanguine, les sporozoïtes vont, via l'artère hépatique ou la veine porte, se diriger vers le foie dans le but de s'y différencier (**Figure 1**). Les sporozoïtes s'arrêtent dans les sinusoides hépatiques, traversent les cellules endothéliales et les cellules de Kupffer pour avoir accès aux hépatocytes.[12] Ils traversent plusieurs hépatocytes en rompant leurs membranes cellulaires, pour ressortir de leur cytoplasme avant d'envahir productivement l'un

d'eux. Ils formeront dans cet hépatocyte une vacuole parasitophore, séparant le sporozoïte du cytoplasme de la cellule hépatique, et s'y différencieront. La phase de traversée cellulaire sera nommée invasion non productive et pourra engendrer l'apoptose des cellules traversées. Afin de traverser les différentes cellules, les micronèmes du sporozoïte vont synthétiser des protéines comme SPECT<sup>1</sup> (SPECT1, SPECT2) ou encore CelTOS.[13,14] Le mode d'action de ces protéines est mal connu. SPECT2 permet surtout la traversée des cellules dermiques et des cellules sinusoidales grâce à son domaine MACPF<sup>2</sup>. Ce domaine est présent dans les protéines formant des pores dans les membranes cellulaires. Une de ces protéines est la perforine. Les protéines qui contiennent ce type de domaine vont se lier aux membranes plasmiques des cellules cibles, s'insérer dans la bicouche phospholipidique et provoquer une oligomérisation et un changement de conformation. Ces protéines deviennent alors transmembranaires. Il y a alors formation d'un pore.

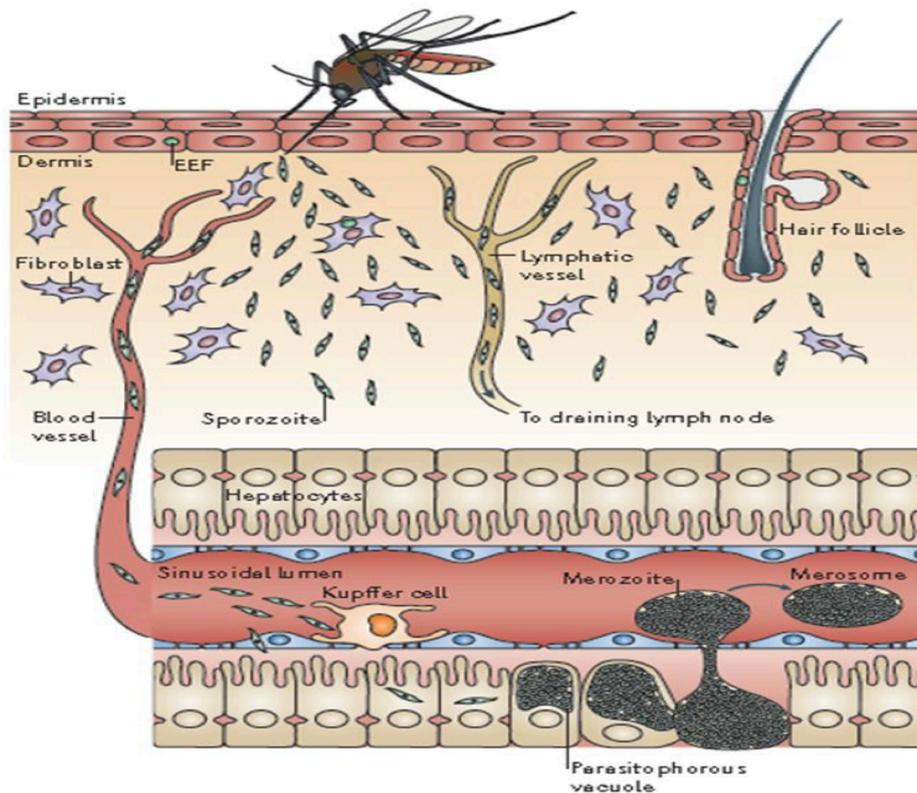
L'invasion non productive va engendrer la cytolysse d'hépatocytes et la libération d'un facteur de croissance hépatocytaire (HGF) qui induirait l'activation du récepteur à tyrosine kinase MET, activant de la sorte la PKC  $\zeta$  et l'activation en cascade de la NF-kB. Cette cascade d'activation induirait l'expression de la CXCR4 dans les hépatocytes et induirait une augmentation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire, induisant à son tour la transformation des sporozoïtes en formes exoérythrocytaires (EEFs).

La traversée des hépatocytes et donc l'invasion non productive permettrait dès lors l'activation de l'invasion productive et le développement de la vacuole parasitophore.[13] (**Figure 1.**) Le parasite, une fois dans l'hépatocyte, se nourrit de son cytoplasme.

---

<sup>1</sup> « Sporozoite Protein Essential for Cell Traversal »

<sup>2</sup> « Membrane Attack Complex/Perforin »



*Figure 1. Parcours des sporozoïtes à partir de la piqûre du moustique jusqu'aux cellules hépatocytaires.[13]*

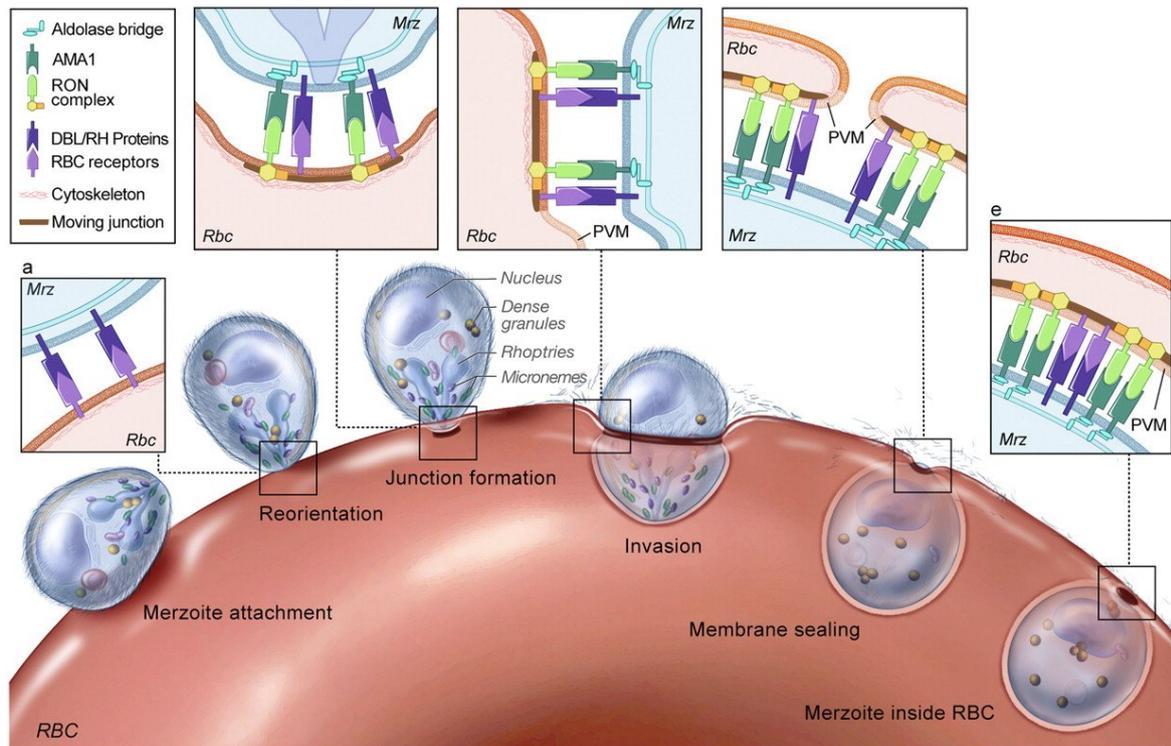
A la surface du sporozoïte, la CSP<sup>3</sup> doit être clivée dans le but d'exposer la région carboxy-terminale II.[12] Une fois fixés aux HSPG<sup>4</sup> hépatocytaires (CD81) via la région carboxy-terminale II de la protéine de surface CSP, les sporozoïtes vont procéder à la schizogonie hépatique. [3,9,12,13] C'est un processus qui consiste en la multiplication binaire des sporozoïtes et par conséquent, former de nouveaux parasites. Le sporozoïte se différencie en mérozoïtes.[3,13]

Ils sont destinés à retourner dans la circulation sanguine afin d'infecter des érythrocytes. (Figure 1.) [9] Pour se faire, les mérozoïtes vont inhiber l'enzyme cellulaire AMPK ce qui provoque un stress oxydatif au sein de la mitochondrie de l'hépatocyte. Cette inhibition mène à l'apoptose de l'hépatocyte via les phagocytes. Afin d'échapper aux cellules de Kupffer, le mérozoïte synthétise une membrane protectrice, le mérosome. Ce mérosome permet donc aux parasites d'atteindre la circulation sanguine de façon intacte. [9]

<sup>3</sup> La CSP est une protéine circumsporozoïte. Cette protéine possède une structure composée d'une région centrale, une région I [13]

<sup>4</sup> HSPG sont des molécules ubiquitaires qui sont localisées à la surface des cellules des mammifères. Les HSPG hépatiques sont hautement sulfatés ce qui permet une meilleure interaction des sporozoïtes aux HSPG. [13]

Les parasites vont envahir les globules rouges par liaison d'une protéine transmembranaire AMA-1<sup>5</sup> à la protéine RON2<sup>6</sup> de l'hématie afin de former une jonction mobile et ainsi permettre leur entrée dans la cellule hôte. [3,9,13] RON2 change de conformation dans le but d'exposer la boucle C-terminale à la surface de la cellule hôte.[14]



**Figure 2.** Exemple de formation d'une jonction mobile entre AMA1 sécrété par un mérozoïte avec la boucle C-terminale de RON2 du complexe macromoléculaire au niveau de la membrane de la cellule hôte (érythrocyte). [14]

Comme pour les sporozoïtes, les mérozoïtes s'entourent d'une vacuole parasitophore lors de la pénétration dans les hématies. (Figure 2.)[14] Ils vont procéder à la schizogonie afin de produire de nombreux autres mérozoïtes via une reproduction asexuée.

A cette étape, on parle d'un parasite sous forme de trophozoïte. Celui-ci va suivre plusieurs étapes de développement: jeune trophozoïte, trophozoïte mature, schizonte érythrocytaire qui est formé de plusieurs mérozoïtes. Les mérozoïtes présents dans les hématies dégradent l'hémoglobine pour en utiliser les acides aminés libérés.[3]

Le nombre de mérozoïtes produit par schizogonie dans les GR varie de 8 à 32 en fonction de l'espèce du parasite. [3]

<sup>5</sup> Apical Membrane Antigen 1 est un antigène sécrété par le micronème du parasite afin de se lier à RON2

<sup>6</sup> Fait partie du complexe macromoléculaire de protéines de rhoptries. Ce complexe comprend RON2, RON4, RON5, RON8. Il est sécrété au niveau de la membrane de la cellule hôte : l'hématie.

La schizogonie suivie de la libération des mérozoïtes de façon à contaminer des globules rouges sains se nomme « cycle de propagation intra-érythrocytaire ». Ce dernier peut être répété à plusieurs reprises. Cependant, le temps d'un cycle varie en fonction de l'espèce du parasite.

*Plasmodium knowlesi* répète ce cycle toutes les 24 heures alors que le cycle du *Plasmodium falciparum*, du *Plasmodium vivax* et du *Plasmodium ovale* dure 48 heures.

Pour le *Plasmodium malariae*, il peut également durer le triple du temps de celui du *Plasmodium knowlesi*. [3,4,8,9]

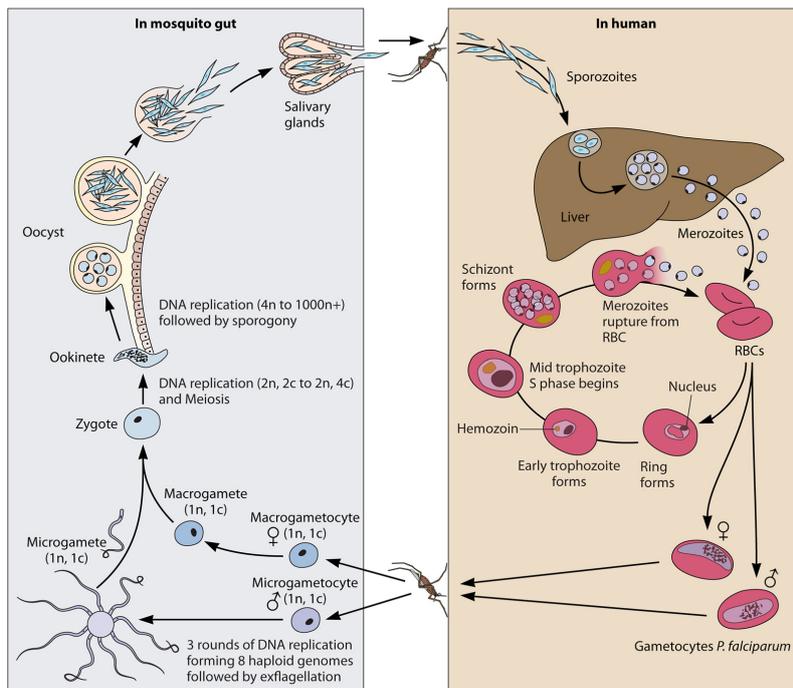
Le schizonte augmentant de taille, finira par occuper toute la place disponible au sein du GR, conduisant ainsi à la rupture du GR et à la libération du contenu.

En parallèle, certains mérozoïtes se différencient en gamétocytes; c'est la gamétogénèse.

Les gamètes mâles et femelles ainsi présents dans le sang de l'hôte humain, pourront être absorbés lors de la piqûre par le moustique et se retrouver dans le tube digestif du moustique *Anopheles*. [3]

Les gamétocytes débutent le cycle sporogonique. Certaines espèces de parasite comme le *Plasmodium vivax*, vont directement produire des gamétocytes durant leurs « cycles de propagation intra-érythrocytaires ». D'autres espèces devront subir plusieurs « cycles de propagation intra-érythrocytaires » avant de pouvoir se différencier en cellules reproductrices, gamétocytes mâles et femelles.

La reproduction sexuée commence au niveau de la lumière intestinale. Les gamétocytes ainsi ingérés par le moustique se transforment en gamètes mâles (microgamètes) et femelles (macrogamètes). La fécondation d'un macrogamète femelle par les microgamètes mâles conduit à la formation d'un zygote [13]. Les zygotes bourgeonnent et se transforment en ookinètes. L'ookinète est un œuf mobile qui va se fixer au niveau de la paroi de l'estomac. Les ookinètes traverseront les cellules stomacales grâce à la protéine CelTOS qu'ils expriment. Ceux-ci vont mûrir et se différencier en oocystes dans lesquels vont se développer les sporozoïtes. La rupture des oocystes libérera les sporozoïtes qui gagneront les glandes salivaires du moustique [3,13] dans lesquelles ils pénétreront suite à la liaison via la région amino-tertiaire I de la CSP. A l'occasion d'une piqûre de moustique *Anopheles*, les sporozoïtes contenus dans les glandes salivaires, seront injectés à l'hôte humain, conduisant à son infection et à un nouveau cycle. [3,13]



**Figure 3.** Le cycle de vie du *Plasmodium*. Le cycle implique deux hôtes: un moustique *Anopheles* femelle et un être humain. [8]

### 1.1.3 Vecteur et transmission de la maladie

Le moustique femelle du genre *Anopheles* est le vecteur de la malaria. Le vecteur ainsi que le parasite et l'hôte humain existent dans un environnement bien précis. Cet ensemble compose le système de la malaria. L'association vecteur, parasite, hôte humain et environnement est nécessaire pour la transmission de la malaria. [3,16] De nombreux facteurs influencent cette transmission.

(i) Le vecteur: Pour transmettre l'agent infectant responsable de la malaria à l'Homme, le moustique *Anopheles* femelle doit premièrement être infecté par le parasite.

Ce moustique sera infecté via une consommation de sang humain contaminé par le parasite *Plasmodium*.

Seul le moustique de sexe féminin transmet le parasite causant la malaria en injectant sa salive contaminée dans l'hôte humain; dont il se nourrit afin d'obtenir les protéines utiles à l'ovogenèse.

La ponte des œufs se réalise généralement dans les 3 jours qui suivent le repas sanguin dans un environnement chaud et humide. [3]

Quelques facteurs comme son espèce, son alimentation, son environnement, son type de morsure, sa résistance aux insecticides, sa durée de vie ainsi que sa reproduction jouent sur ce vecteur. Cela peut impacter la transmission de la malaria de façon positive ou négative. [16]

Il existe différents complexes d'espèces de moustiques *Anopheles*. Au sein de ces complexes, les espèces possèdent une génétique différente alors que leur morphologie est identique. [3] 41 complexes d'espèces sont considérés comme étant les vecteurs dominants capables de transmettre la malaria. Ces complexes sont distribués partout dans le monde. En Afrique, on retrouvera *A. funestus*, *A. arabiensis*, *A. gambiae*, *A. melas*, *A. merus*, *A. mouchetti* ou encore *A. nili*.

D'autres complexes seront localisés dans d'autres régions comme en Amérique (*A. albimanus*), en Europe (*A. sacharovi*), en Asie (*A. dirus*). [3,18]

Un nombre restreint de moustiques *Anopheles* permet de transmettre la malaria. La transmission va notamment dépendre des moustiques et de leur capacité vectorielle. La transmission peut être limitée par différents facteurs comme le développement du moustique, la durée de vie du moustique ou encore du climat de la région qui permettra de créer un milieu propice ou non au bon développement de l'*Anopheles*. [3,18]

De plus, le taux de transmission sera plus ou moins important en fonction de différents critères: la densité du moustique *Anopheles*, leur localisation et leur alimentation. Les espèces anthropophiles<sup>7</sup> et endophiles<sup>8</sup> sont essentielles pour la transmission du parasite. [3]

Les complexes *Anopheles gambiae* et *Anopheles funestus* sont les principaux vecteurs de la malaria en Afrique. Ils ont développé une transmission efficace de la maladie. Ils se nourrissent du sang humain lorsque ceux-ci sont endormis, à l'intérieur de leurs habitats ; les moustiques sont attirés, entre-autre, par le CO<sub>2</sub> dégagé par la personne endormie. Ce sont donc des espèces anthropophiles et de type endophiles. [10]

L'intensité de la transmission est évaluée par le TIE (Taux annuel d'Inoculation Entomologique). Ce taux est calculé par le nombre de personnes qui ont reçu une inoculation de sporozoïtes pendant un an dans une zone géographique bien définie. [3]

Plus l'interaction entre le vecteur et l'Homme est importante, plus la transmission sera considérée comme « efficace ». [18]

(ii) L'Homme: Les sporozoïtes inoculés vont se développer dans l'organisme humain. Lorsque l'Homme infecté est piqué par un moustique *Anopheles* femelle, il transmet les gamétocytes du *Plasmodium* au moustique. Cela signifie que l'Homme participe également à la transmission de la malaria.

Des facteurs génétiques présents chez certains individus permettent de les protéger des différents types de la malaria.

---

<sup>7</sup> « *Anopheles* qui se nourrissent de sang humain. » [3]

<sup>8</sup> « *Anopheles* qui se retrouvent dans les habitats humains. » [3]

En effet, les porteurs hétérozygotes du gène de la drépanocytose<sup>9</sup>[19] seraient protégés contre les infections causées par le *Plasmodium*. Cela s'expliquerait par l'implication d'un facteur de transcription Nrf2 dans la réaction permettant la libération de l'enzyme « Hème Oxygénase 1 » (HO-1) lors de l'hémoglobinopathie. Cette enzyme libérée va elle-même produire du CO qui empêche le relargage de l'hème libre dans le sang qui provoque des effets cytotoxiques et joue un rôle important dans la pathogénicité de la malaria. [19,20,21,24]

De plus, les personnes négatives au groupe sanguin Duffy<sup>10</sup> avec un phénotype Fy(a-,b-)<sup>11</sup> présentent une résistance au *Plasmodium vivax* et au *Plasmodium knowlesi*, puisque ces deux parasites doivent interagir avec l'antigène Duffy (Fy<sup>a</sup> et Fy<sup>b</sup> codifiés par l'allèle FYA et FYB) afin de pénétrer dans les hématies. [22] La malaria n'est donc plus occasionnée par *P. vivax* et par *P. knowlesi* mais pourra néanmoins contaminer la population africaine via *P. ovale* qui est capable d'infecter les personnes Duffy négative. [20,23,24]

En outre, certaines personnes ont une immunité acquise suite à un contact régulier avec le *Plasmodium*; elles peuvent développer une immunité partielle. Cela signifie qu'elles seront partiellement protégées de la malaria, on parle alors de personnes « semi-immunes ». Ces personnes pourraient encore être infectées mais ne développeraient pas de formes sévères.

Les nouveau-nés acquièrent les anticorps maternels ce qui leur permet d'être protégés de la malaria durant quelques mois après leur naissance. Les AC diminuent avec le temps ce qui les rend hautement à risque d'être infectés et ainsi de développer les complications de la malaria voire d'en mourir. Cependant, s'ils survivent aux différentes infections occasionnées avant leurs 5 ans, ils auront acquis une immunité partielle. [24]

Enfin, certains comportements humains permettent d'influencer la transmission de la malaria. Cette transmission pourrait être diminuée en prenant quelques précautions comme mettre des moustiquaires autour du lit, éviter les élevages d'animaux près de l'habitation ou encore éviter de travailler la nuit. Il faudrait également assurer un meilleur suivi des personnes infectées afin de les soigner correctement et de façon non-frauduleuse. Cependant, le manque de moyens dans

---

<sup>9</sup> « Maladie récessive causée par une mutation monogénique qui affecte l'hémoglobine. » [24]

<sup>10</sup> Le gène du groupe sanguin érythrocytaire Duffy, localisé sur le bras long du chromosome 1 est FY dont le produit issu de ce gène est une glycoprotéine transmembranaire. Le système Duffy comporte 4 allèles, 5 phénotypes et 5 antigènes (Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, Fy3, Fy5, Fy6) exprimés sur la glycoprotéine Duffy Antigen Receptor for Chemokines (DARC).

<sup>11</sup> Le phénotype Fy(a-,b-) est présent surtout chez les individus noirs comme les Afro-Américains et les Africains occidentaux. Ce phénotype représente le génotype FYB<sup>SE</sup>/FYB<sup>SE</sup>. On parle alors d'un allèle FYB silencieux au niveau du locus Duffy (FYA/FYB). FYB<sup>SE</sup> présente la même structure que l'allèle FYB mais présente une mutation au niveau de la région promotrice GATA là où adhère GATA-1, un facteur de transcription.

certains pays, l'absence d'élaboration ou de la mise en place de protocoles adéquats participent à pérenniser la transmission. Les médicaments, les équipements, les formations de professionnels de la santé sont souvent manquants. [19]

#### 1.1.4 Clinique et physiopathologie

Une personne infectée par la malaria peut être asymptomatique ou au contraire, symptomatique. Toutefois, les conséquences sont souvent non négligeables. La maladie peut mener au développement de formes graves, voir au décès des personnes infectées.

On distingue quatre formes cliniques.[6]L'accès palustre simple se caractérise par un état grippal, de la fièvre, des maux de tête, des douleurs abdominales, des nausées et vomissements ou encore une jaunisse légère. La forme sévère de malaria présente une symptomatologie semblable à celle de l'accès palustre simple mais cliniquement plus sévère. Ces formes sévères sont caractérisées par le développement d'atteintes organiques: affections cérébrales qui, parfois, mènent au coma, de l'hémoglobinurie, des affections rénales ou encore de l'acidose métabolique qui se complique de détresse respiratoire.[6,22,25,26] De l'anémie sévère est également observée. Le malaria neurologique représente l'atteinte du système nerveux central associé à une défaillance multiviscérale. La malaria viscérale évolutive est caractérisée par l'installation d'une malaria chronique qui s'accompagne de fatigue, de perte d'appétit, d'amaigrissement, de dyspnée, d'épisodes de fébricules.

Les symptômes cliniques surviennent suite à la phase de développement érythrocytaire du parasite. Lors de la lyse des érythrocytes infectés, il y aura libération dans la circulation de pigment malarique, microvésicules, arginase, ADMA (asymmetric dimethylarginine), GPI (glycosylphosphatidylinositol) en même temps que les mérozoïtes prêts à envahir de nouveaux érythrocytes. Le GPI, les microvésicules et le pigment malarique vont activer l'immunité de l'hôte en stimulant des cellules immunitaires comme les macrophages. Ils stimulent également les cellules produisant des cytokines ainsi que des facteurs solubles qui vont provoquer de la fièvre, des frissons et d'autres pathologies. [26]L'acidose métabolique est due à l'accumulation d'acide lactique, produit par la glycolyse anaérobie au sein des tissus insuffisamment perfusés et à la production de pLDH par le parasite malarique. Cette enzyme permet la synthèse d'acide lactique, entraînant une baisse de pH. [5]

Quant aux autres manifestations graves comme les affections neurologiques, les GR infectés par *P.falciparum* adhèrent aux récepteurs présents au niveau des cellules de l'endothélium des

vaisseaux sanguins via les différents domaines de la protéine de surface PfEMP1<sup>12</sup>. Les gènes *var*<sup>13</sup> codent les protéines de surface des érythrocytes infectés et sont responsables des effets secondaires thrombogènes engendrés par *P.falciparum*. Les GR cytoadhérants vont alors s'accumuler dans les vaisseaux sanguins et entraînent la formation d'un thrombus. Dans la malaria gestationnelle, le procédé est similaire au procédé responsable de l'atteinte neurologique. En effet, les érythrocytes infectés par le *P.falciparum*, vont être isolés au niveau du placenta via le phénomène de cytoadhérence via PfEMP1 codé par VAR2CSA qui interagit avec les récepteurs CSA (chondroïtine sulfate A). Tout ce mécanisme mène à de l'anémie fœtale ou chez les nouveau-nés. On comprend dès lors que ces mécanismes communs de cytoadhérence, n'auront pas les mêmes conséquences selon les tissus touchés.

Toutes ces complications peuvent mener au décès ; une prise en charge rapide de ces patients est essentielle. [13,25]

Notons que certaines personnes pourront développer des symptômes cliniques quelques temps après leur première infection. Ce phénomène est dû à la présence des parasites *P.vivax* ou *P.ovale* sous forme latente dans les hépatocytes. Ces formes dormantes sont appelées hypnozoïtes. [13,25]

Malgré que ces espèces de *Plasmodium* soient moins virulentes que *P.falciparum*, *P.vivax* peut potentiellement occasionner des pathologies mortelles. [13,25]

### 1.1.5 Diagnostic

Des tests diagnostiques sont utilisés afin de détecter la présence de *Plasmodium* chez un individu. Cette détection rapide du parasite est essentielle pour la prise en charge précoce et pour limiter le développement des complications.

Il existe différentes méthodes pour diagnostiquer l'infection au *Plasmodium* dans le sang de l'hôte: la microscopie, la PCR, la Fluorescence ou encore les TDRs (**Figure 4**).

Les tests diagnostiques via microscopie optique et PCR nécessitent des connaissances scientifiques suffisantes que pour pouvoir les utiliser. La PCR est une technique très sensible mais elle est longue et onéreuse. Elle se justifie dans les cas de difficulté diagnostique en microscopie, pour l'identification de l'espèce plasmodiale ou pour l'étude des gènes de résistance au traitement mais n'est pas compatible avec l'urgence du diagnostic de la malaria. La sensibilité de la PCR est telle qu'elle permet de détecter l'ADN de parasites non viables

---

<sup>12</sup> "*P.falciparum* erythrocyte membrane protein 1". C'est une protéine présente à la surface des érythrocytes.

<sup>13</sup> Les gènes *var* sont classés en 3 sous-familles A,B,C. Les gènes du groupe A sont liés au paludisme cérébral. En effet, PfEMP1 du groupe A permettent la liaison des GR infectés au récepteur endothélial de la protéine C (EPCR) et une liaison à la molécule d'adhésion intracellulaire 1 (ICAM1) au niveau du cerveau. [26]

encore présent dans l'organisme, engendrant un risque de faux positifs. Cependant, microscopie et PCR ont une limite de détection relativement faible ce qui permet de détecter la présence de n'importe quelle espèce à un taux très faible de parasites /  $\mu\text{L}$ . (**Figure 4**). Ils sont sensibles et spécifiques.

Les TDRs quant-à eux, sont des tests basés sur des détections immunologiques des antigènes du parasite comme HRP-2, pLDH, aldolase. Il existe 3 types de TDR: le TDR qui reconnaît spécifiquement l'HRP-2 du *Plasmodium falciparum*; le TDR qui reconnaît spécifiquement pLDH et enfin, le TDR qui reconnaît l'aldolase. Les TDRs pLDH et aldolase peuvent détecter la présence de *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. knowlesi*. [25,27]

**Tableau 1.** Ce tableau reprend les différentes méthodes utilisées afin de détecter la présence des différentes espèces de *Plasmodium*. Ce tableau est issu et traduit en français à partir de [27].

Paramètre	Microscope	PCR	Fluorescence	Dipstick HRP-2	Dipstick pLDH, ICT Pf/Pv
Sensibilité	50	5	50	>100	>100
Spécificité	Toutes espèces	Toutes espèces	<i>P. falciparum</i> bonne, autres difficiles	Seulement <i>P. falciparum</i>	<i>P. falciparum</i> et <i>P. vivax</i> bonne, <i>P. ovale</i> et <i>P. malariae</i> seulement avec pLDH.
Densité parasitaire parasitémie	OUI	NON	NON	Estimation grossière	Estimation grossière
Temps des résultats	30-60 min	24h	30-60 min	20 min	20 min
Niveau de compétence	Élevé	Élevé	Modéré	Bas	Bas
Équipement	Microscope	Appareil PCR	Appareil QBC ou microscope à fluorescence directe.	Kit seulement	Kit seulement
Coût/test	Bas	Élevé	Modéré/bas	Modéré	Modéré

Les TDRs sont faciles à mettre en œuvre, ne demandent pas de personnes qualifiées et sont indiqués dans des structures non spécialisées, en l'absence de diagnostic microscopique. Ces TDRs sont malheureusement souvent associés à un taux accru de « faux-positif » et de « faux-négatif ». [24,27] Les performances de ces tests rapides dépendent de la parasitémie du sujet infecté. Leurs résultats devront être vérifiés si possible, par examen microscopique qui demeure le « gold standard » en terme de diagnostic. Leur positivité permettra une prise en charge rapide du patient infecté. La négativité de ce test ne devra pas exclure pour autant une vérification du diagnostic de malaria. Lorsque le traitement antipaludique est terminé, la plupart des TDRs ne détecteront plus la présence de *Plasmodium* alors que le TDR qui reconnaît les HRP-2 pourra la détecter jusqu'à 3 semaines après la fin du traitement. [27]

### 1.1.6 Préventions et traitements

La mise en place d'outils de prévention contre la malaria est nécessaire à la réduction des infections au *Plasmodium*; ceci afin de réduire les décès liés à cette maladie. Plusieurs méthodes de prévention comme la lutte antivectorielle, la chimioprévention et la vaccination sont utilisées.

La **lutte antivectorielle** consiste en l'utilisation de barrières physiques comme les moustiquaires imbibées d'insecticides. Ceux-ci sont également pulvérisés au domicile. [28] Cette lutte antivectorielle permet un effet répulsif sur les moustiques *Anopheles* et par conséquent, limite les piqûres et la transmission de la malaria.

Cependant, les moustiques *Anopheles* peuvent acquérir une résistance aux insecticides : métabolique (augmentation du niveau d'une ou de plusieurs enzymes capables de dégrader ou de séquestrer les insecticides), par mutation de cibles (mutations ponctuelles empêchant la fixation de l'insecticide sur les molécules réceptrices des neurones du moustique), par réduction de la pénétration et comportementale. [29,30,31] Des campagnes de lâcher de moustiques mâles stériles sont également à l'étude. [32]

La **chimioprévention**, quant à elle, utilise des médicaments seuls ou associés dans le but d'éviter une potentielle infection malarique. À ce jour, selon l'âge, l'état de santé du patient, on utilise de l'atovaquone-proguanil, de la doxycycline ou encore de la méfloquine<sup>14</sup>. Ces médicaments remplacent la chloroquine pour laquelle *P. falciparum* a acquis une résistance. La chloroquine reste le traitement antipaludéen de première ligne contre *P. vivax*. Cette prévention est toutefois menacé par l'émergence de souches *P. vivax* résistantes à la chloroquine. Le besoin de recourir à la chimioprophylaxie dépendra de la destination géographique du sujet, de la saison, de la durée de l'exposition aux moustiques ou encore, de l'altitude. En effet, au-dessus de 1500 m en Afrique et 2500 m en Amérique/Asie, il n'y a plus de malaria. Ces traitements préventifs doivent être scrupuleusement suivis et être continués quelques semaines après le retour de la région endémique car certains parasites comme *P. vivax*, peuvent être latents dans l'organisme. [1,33]

Depuis octobre 2021, il est possible de **vacciner** contre la malaria les enfants qui vivent dans des régions endémiques. Le vaccin RTS,S/AS01 (*Mosquirix*, GSK) était efficace à prévenir un premier épisode clinique du paludisme chez 56 % des enfants âgés de 5-17 mois et chez 31 %

---

<sup>14</sup> « CBIP ». CBIP, [https://www.cbip.be/fr/chapters/12?frag=19398&view=pvt&vmp\\_group=20248](https://www.cbip.be/fr/chapters/12?frag=19398&view=pvt&vmp_group=20248) consulté le 19/06/22

des enfants âgés de 6 à 12 semaines. L'efficacité du vaccin a diminué après un an. Le vaccin contient la région C-terminale ainsi qu'un domaine central de répétition de la protéine CSP. Cette protéine exprimée à la surface des sporozoïtes est ciblée par les anticorps anti-CSP après la vaccination. Le but étant d'empêcher l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes et ainsi d'empêcher leur différenciation en mérozoïtes. [1,34] Plus la réponse immunologique est rapide, plus l'efficacité du vaccin RTS,S est susceptible d'être efficace. En effet, les sporozoïtes sont capables d'envahir les hépatocytes en un quart d'heure. Il est essentiel que les anticorps agissent rapidement afin de neutraliser les sporozoïtes. [34] Dans le cas où la réponse immunologique ne serait pas assez rapide, il y a un risque que certains sporozoïtes réussissent à rentrer au niveau des hépatocytes et ainsi continuer leur développement sanguin. Il serait intéressant de développer un vaccin antipaludique qui agirait contre les sporozoïtes mais également contre les mérozoïtes. [34]

Malgré la mise en place de méthodes de prévention, certains patients développeront toutefois la malaria. Ces personnes infectées recevront un **traitement adapté**. Celui-ci dépend de plusieurs critères: la sévérité de la maladie, l'espèce du parasite, l'âge du patient, son immunité, la sensibilité aux médicaments antipaludiques, du coût des médicaments et de leur disponibilité. Tous ces critères varient en fonction des zones géographiques. [35]

Dans les années 1990, l'introduction de dérivés de l'artémisinine en association avec d'autres molécules, a permis de traiter de manière sûre et efficace les infections aux parasites *Plasmodium* et plus précisément au *Plasmodium falciparum*. [36,37,38] Le peu de solubilité dans l'eau et l'huile ainsi que l'instabilité de cette molécule, la rend difficilement exploitable. Aujourd'hui, le traitement de choix en cas d'infection sévère est un traitement d'artésunate administré par voie intraveineuse. Cette formulation est possible grâce à sa solubilité dans l'eau. D'autres alternatives sont possibles comme la quinine ou l'artéméther<sup>15</sup>, toutes deux administrées par voie parentérale également. L'artéméther de par sa liposolubilité supérieure à celle de l'artémisinine et de l'artésunate, peut être injectée via une préparation huileuse en intramusculaire. Dès que le patient sera capable d'avaler et après avoir reçu un traitement parentéral de minimum 24h, il recevra une médication orale à base d'artémisinine. Plus précisément, on parlera de thérapie combinée à base d'artémisinine. Dans le cadre d'une infection malarique non-compiquée, les traitements seront en fonction des espèces. Concernant les infections par *P. falciparum* et *P. knowlesi*, il existe 5 thérapies combinées possibles:

---

<sup>15</sup> « CBIP ».CBIP, [https://www.cbip.be/fr/chapters/12?frag=10629&view=pvt&vmp\\_group=2212](https://www.cbip.be/fr/chapters/12?frag=10629&view=pvt&vmp_group=2212). Consulté le 10/06/22

artéméter-luméfantrine, dihydroartémisinine-pipéraquline, artésunate-méfloquine, artésunate-amodiaquine et enfin, artésunate-sulfadoxine-pyriméthamine. Les trois autres espèces, *P.vivax*, *P.ovale*, *P.malariae* restent, quant-à-elles, sensibles à la chloroquine. [39]

Ces anti-malariques peuvent occasionner de nombreux effets-indésirables qui varient d'un patient à l'autre: quinine et quinidine peuvent provoquer des troubles cardiaques alors que la méfloquine peut occasionner des pathologies neuropsychiatriques. Un suivi clinique des patients sous anti-malariques est recommandé. [40] Notons que chez certaines personnes, des symptômes peuvent survenir quelques semaines après le premier traitement. Cela est dû à la réapparition des parasites chez l'hôte. Plusieurs causes pourraient être à l'origine de cette réapparition comme une prise incorrecte des anti-malariques, l'utilisation de médicaments falsifiés, une non-adhérence à la thérapie ou encore la présence de formes latentes. [39]

## 1.2. Hémozoïne

### 1.2.1 Définition

L'hémozoïne, aussi appelée pigment malarique est un produit issu de la dégradation de l'hémoglobine et de la détoxification de l'hème par le parasite. Ce processus a lieu dans sa vacuole digestive. En effet, l'hémoglobine contenue dans les hématies est transférée vers la vacuole digestive par pinocytose. Cette vacuole présente un environnement acide. À ce pH, l'oxydation de l'oxyhémoglobine<sup>16</sup> mène à la production de méthémoglobine<sup>17</sup> et à la libération de produits toxiques comme  $O^{\cdot}_2$  qui se dismute en dioxygène et peroxyde d'hydrogène. (**Figure 5.**) Ensuite, les protéases aspartiques clivent le lien entre l'acide aminé 33Phe et 34Leu de la méthémoglobine. Il y a alors formation d'un hème libre et d'une globine dénaturée non-active. Chacun de ces deux composés vont subir des réactions. La globine dénaturée sera hydrolysée en oligopeptides puis en dipeptides par des protéases parasitaires<sup>18</sup> afin d'être à leur tour hydrolysés en acides aminés qui seront utilisés par le parasite pour sa synthèse protéique. (**Figure 6.**) Quant à l'hème libre, celui-ci est détoxifié afin de ne plus être toxique pour le parasite. Il peut également être toxique pour l'hôte humain. En effet, l'hème induit la production d'espèces oxygénées qui sont réactives et vont potentiellement provoquer des dommages au niveau de l'ADN et des protéines. Les radicaux libres occasionnent également une peroxydation lipidique des membranes et provoquent l'hémolyse des GR. Un tiers de l'hème est polymérisé en un cristal nommé hémozoïne dans la vacuole digestive parasitaire alors que les deux tiers

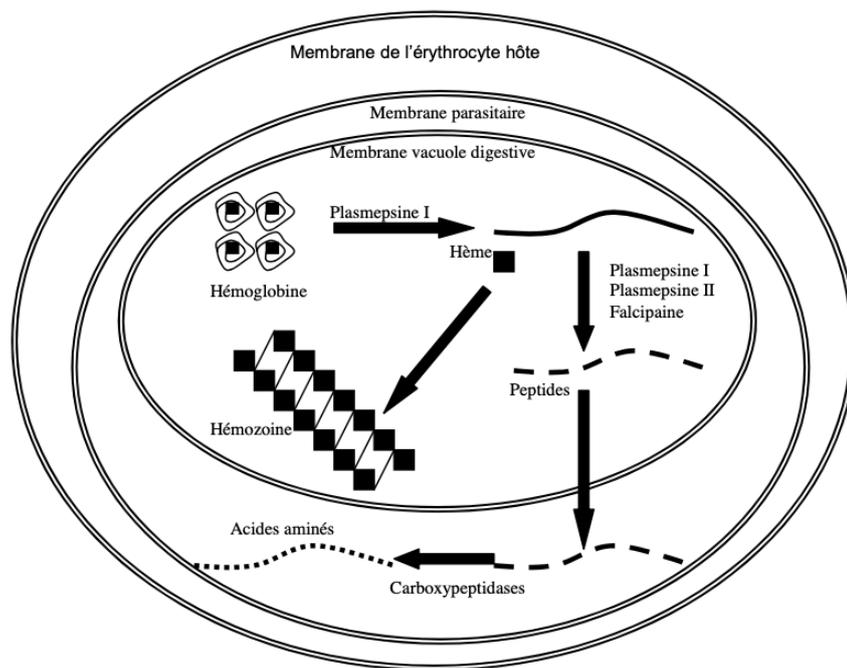
---

<sup>16</sup> Le fer est à l'état ferreux ( $Fe^{2+}$ ) ce qui permet le transport de l'oxygène. [41]

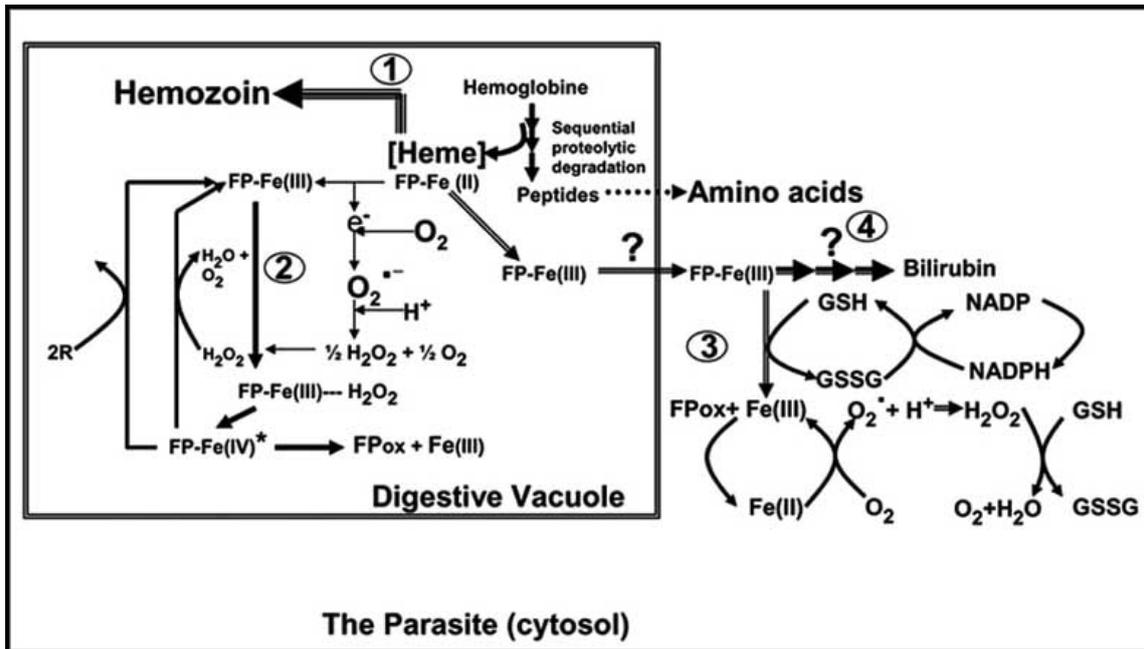
<sup>17</sup> Le fer de l'hème est ferrique ( $Fe^{3+}$ ). Celui-ci est incapable de transporter de l'oxygène. Un taux élevé de méthémoglobine provoque une anémie chez l'hôte. [41]

<sup>18</sup> Les protéases parasitaires incluent la sérine-protéase, les aspartines-protéases, les cystéines-protéases.

restants sont détoxifiés par d'autres mécanismes qui ont lieu dans le cytoplasme de la vacuole parasitophore. (**Figure 6.**) Parmi les autres voies de détoxification de l'hème, une réaction au niveau de la rate est menée par l'hème oxygénase. Cette enzyme permet de détoxifier l'hème libre en bilirubine. L'hème peut également être détoxifié par le peroxyde d'hydrogène ou par la superoxyde dismutase. Des protéines de liaison à l'hème incluant la glutathion réductase, la glutathion S-transférase, la glycéraldéhyde-3-phosphate, la protéine disulfure isomérase peuvent également diminuer la toxicité de l'hème. [3,40,41,42,43]



**Figure 4.** Schéma reprenant les réactions responsables de la dégradation de l'hémoglobine, de la formation d'hémozoïne et de la formation des acides aminés. L'hémozoïne est issue de la polymérisation des groupements héminiques. [40]



**Figure 5.** Voies de détoxification de l'hème chez *Plasmodium*. **Voie (1)** Cristallisation de l'hème en hémozoïne; **Voie (2)** Dégradation peroxydative de l'hème; **Voie (3)** Dégradation de l'hème par l'intermédiaire du Gluthation; **Voie (4)** Dégradation enzymatique de l'hème en bilirubine. Les deux dernières voies nécessitent le passage de l'hème libre de la vacuole digestive vers le cytosol du parasite. [43]

L'hémozoïne est de nature cristalline, de coloration noire brunâtre et est insoluble dans les conditions physiologiques. Au contraire de l'hème libre, l'hémozoïne n'induit pas de stress oxydatif.

Après avoir été libérée dans le sang, l'hémozoïne atteint l'hypothalamus et influe sur ce centre de la thermorégulation, provoquant de fortes fièvres chez l'hôte humain. [42]

L'hémozoïne peut altérer la réponse immunitaire chez l'hôte, une fois libérée suite à la lyse érythrocytaire. La réponse cellulaire pourra être altérée: on pourra observer une diminution de la réponse immunitaire suite à la présence antigénique, une baisse de la prolifération des cellules T CD4+ et un déclin de la production d'anticorps.

Lors de l'interaction hémozoïne-phagocytes, ceux-ci vont ingérer l'hémozoïne qui va stimuler la synthèse de facteurs inflammatoires et par conséquent, activer les voies inflammatoires en interagissant avec les récepteurs de surface des phagocytes.[3] En effet, lors de l'ingestion de l'hémozoïne, les phagocytes vont sécréter de l'IL-1. Cela va activer les lymphocytes T qui vont sécréter l'interféron IFN- $\gamma$ . Cependant, les cellules immunitaires ayant phagocyté l'hémozoïne ne savent pas exprimer le complexe majeur d'histocompatibilité, CMH II. Les lymphocytes T n'ont pas la capacité de se lier aux CMH II et ne peuvent donc pas détruire les cellules infectées. Il y a alors une accumulation d'IFN- $\gamma$  dans le sang. [42]

### 1.2.2 Voies de synthèse *in vivo*

L'hémozoïne peut être produite via différentes voies de synthèses *in vivo*, permettant de détoxifier l'hème libre. La cristallisation de l'hème étant la plus connue. D'autres voies de synthèses *in vivo* de l'hémozoïne pourraient exister via une réaction autocatalytique ou via des réactions médiées par des protéines ou des lipides. [3]

#### Hypothèse 1 - La réaction médiée par les lipides:

Les lipides joueraient un rôle important dans la biosynthèse de l'hémozoïne. En effet, les lipides impliqués lors de l'invagination de la membrane plasmique parasitaire permettent le transport de l'hémoglobine du GR à partir du milieu extracellulaire au cytoplasme parasitaire. Ils permettraient également d'entourer l'hème monomère issu de la dégradation de l'hémoglobine libérée dans la vacuole digestive afin de le concentrer, de le positionner de façon optimale et ainsi favoriser leur dimérisation. La dimérisation est possible grâce à la précipitation de l'hème avec les lipides (lipide majeur est l'acide linoléique). Cette précipitation crée un environnement avec des propriétés physico-chimiques optimales pour la dimérisation<sup>19</sup> de l'hème monomère. Le dimère formé est ainsi le précurseur de l'hémozoïne. Enfin, afin de former le cristal de l'hémozoïne, les dimères forment des liens hydrogènes entre eux. [3]

#### Hypothèse 2 - La réaction médiée par les protéines:

Les protéines telles que les Histidine Rich Proteins (HRP)<sup>20</sup> et les Heme Detoxification Protein (HDP) pourraient être impliquées dans la biosynthèse de l'hémozoïne. En effet, 3% des HRP II sont présents dans la vacuole digestive du *Plasmodium* dans le but de se lier à l'hème libre. La liaison à l'hème se fait via l'hexa-peptide de la protéine HRP II. HRP II initierait la synthèse de l'hémozoïne. Ensuite, les lipides interviendraient dans la croissance du cristal hémozoïque. Cependant, la présence ou non des protéines HRPII n'affecte pas la forme des cristaux de l'hémozoïne ce qui suggère que cette protéine ne serait pas nécessaire à la formation du pigment malarique. La deuxième protéine qui serait impliquée dans la synthèse de l'hémozoïne est l'HDP. Cette protéine cytosolique est riche en histidine et joue un rôle de conversion. HDP est en association avec la protéine falcipaine et permettent toutes deux la conversion de l'hème de l'hémoglobine en hémozoïne. Cette conversion a lieu dans la vacuole digestive et se passe à un

---

<sup>19</sup> Liens entre le groupement propionate chargé négativement d'un premier Fe(III) PPIX et le noyau Fe (III) positivement chargé. [3]

<sup>20</sup> Les « Histidine Rich Proteins » contiennent un hexa-peptide qui se répète à plusieurs reprises. Sa séquence contient des paires d'acides aminés comme une paire d'histidine (His) et une paire d'alanine (Ala). HRP II contient une séquence hexa-peptidique Ala-His-His-Ala-Ala-Asp. Cette séquence se répète 18 fois au sein de HRP II.

pH acide compris entre 3 et 5,5. L'utilisation d'HDP permettrait une synthèse d'hémozoïne 1000 fois plus importante qu'avec les lipides. [3]

### Hypothèse 3 – La réaction autocatalytique:

L'hypothèse est que la synthèse de l'hémozoïne se fait via un processus de biocristallisation. Le processus de formation de l'hémozoïne est autocatalytique, non enzymatique. En effet, l'hémozoïne préformée aide et stimule à la formation de l'hémozoïne future. [44]

La synthèse de bêta-hématine, analogue synthétique de l'hémozoïne, suit quant-à-elle une cinétique sigmoïde, c'est-à-dire qu'elle est lente à certains moments et rapide à d'autres. La phase rapide correspond à la précipitation de l'hématine qui est un cristal amorphe de 30 nm et la phase lente est la conversion de ce cristal amorphe en bêta-hématine qui est un corps cristallin 10 fois plus long que l'hématine.[3]

Ces trois hypothèses sont encore l'objet de travaux de recherche et les mécanismes sous-jacents ne sont pas tout à fait élucidés. [43,45] Le rôle des différentes molécules impliquées dans ces voies de synthèse n'est pas encore connu précisément. En général, la production de l'hémozoïne est reconnue comme étant une caractéristique des parasites sanguicoles. Cependant, Pek [46] et son équipe ont démontré, lors d'une étude sur des souris déficientes en protéines HRG1 transporteuses d'hème, que leurs macrophages accumulaient de l'hème qui sera polymérisé en hémozoïne. Cependant, ce processus de conversion de l'hème en hémozoïne chez certains mammifères, n'est pas non plus élucidé entièrement. [3]

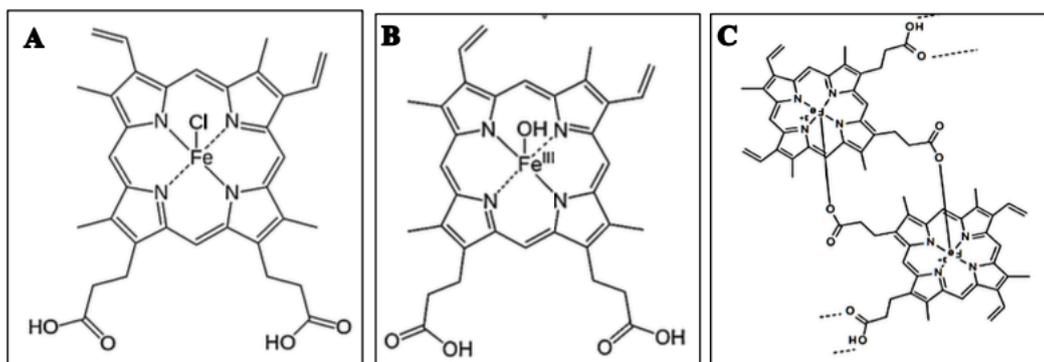
### 1.2.3 Caractéristiques physico-chimiques et biologiques

On peut caractériser les propriétés physico-chimiques du pigment malarique via des méthodes d'analyse telles que la FTIR (Fourier-Transform Infrared Spectroscopy), la SEM (Scanning Electron Microscopy) et la DLS (Dynamic Light Scattering). Ces méthodes ont été utilisées dans le présent travail. Cependant, la MS ( Mass Spectroscopy) [47], LC-VIS permettent également de caractériser les propriétés physico-chimiques de l'hémozoïne. Nous ne nous attarderons pas sur la MS qui ne sera pas développée dans ce travail. L'utilisation de la LC-VIS, par contre, fera l'objet de ce travail ; l'analyse des caractéristiques de l'hémozoïne en LC-VIS sera longuement détaillée.

Au niveau de sa structure, l'hémozoïne est un ensemble de dimères d'hèmes liés entre elles par des liaisons hydrogènes. Le fer a 4 liaisons de coordination avec les 4 azotes du noyau

porphyrine. Il possède également une liaison de coordination avec l'oxygène du groupement carboxylique d'un autre hème. Le pigment malarique apparaît sous forme de petits cristaux rectangulaires. Sa forme ainsi que la taille des cristaux dépendent du stade de développement du parasite, de la méthode d'extraction et purification et de la souche du *Plasmodium* (ex. : la taille des cristaux de la souche *Plasmodium berghei* chloroquino-sensible LNK-65 est plus grande que la taille des cristaux de sa souche chloroquino-résistante [48,49]. D'un point de vue structure moléculaire, l'hémozoïne naturelle est identique à celle de la bêta-hématine commerciale (InvivoGen, France; 93–95%); toutefois, les cristaux de la bêta-hématine commerciale (InvivoGen, France; 93–95%) sont plus petits.[3]

Il est possible de solvater les chaînes carboxylates latérales de l'hématine dans des solvants tels que le bicarbonate de sodium, les solvants aprotiques (Diméthylsulfoxyde (DMSO), pyridine, Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)) alors que l'hémozoïne est insoluble dans ces solutions faiblement basiques. Celle-ci ainsi que la bêta-hématine sont solubles dans l'hydroxyde de sodium. Cette solubilisation est possible par la cassure des liens de coordination entre le groupement carboxylate et le fer ce qui permet la formation d'une solution d'hématine. [3]



**Figure 6.** Les différentes structures chimiques des composés d'hème. **A** :hémine **B** :hématine **C** :hémozoïne/bêta-hématine. [3]

Afin d'analyser physiquement les composés chimiques tels que l'hémozoïne, la bêta-hématine, l'hème, l'hémine et l'hématine, des méthodes spectrales sont utilisées. Ces méthodes spectroscopiques permettent de caractériser les composés chimiques. La molécule analysée doit posséder un caractère anisotrope, c'est-à-dire qu'elle doit présenter des caractéristiques optiques, spectrales qui dépendront de son orientation. Par conséquent, la molécule absorbera la lumière polarisée différemment en fonction de son orientation.

La FTIR permet de différencier l'hémozoïne et la bêta-hématine de leurs précurseurs: hème, hématine, hémine. En effet, l'hémozoïne, d'origine naturelle, et la bêta-hématine, d'origine

synthétique, possèdent des pics caractéristiques communs. Le premier pic caractéristique est celui de  $1664\text{ cm}^{-1}$  qui correspond à la liaison C=O présente dans le groupe carboxylate lié au fer central de la structure (O=C-O-Fe). Le second pic est celui situé à  $1209\text{ cm}^{-1}$  qui représente la vibration de la liaison C-O issue du groupement carboxylate (C-O-Fe). Enfin, le dernier pic caractéristique du pigment malarique est celui en  $1712\text{ cm}^{-1}$ . Ce dernier pic caractérise les liens hydrogènes qui permettent de relier les dimères entre elles<sup>21</sup>. [3,50]

Une autre méthode d'analyse physico-chimique est la DLS. Cette méthode permet de déterminer la distribution de taille des particules en mesurant et interprétant la lumière qui est diffusée au travers de l'échantillon en suspension. Plus les particules ont un diamètre important, plus elles diffuseront lentement. La bêta-hématine commerciale (InvivoGen, France; 93–95%) se compose de cristaux de deux tailles différentes; 84 % des cristaux ont un diamètre moyen de 498 nm et 16 % avec un diamètre de 165 nm. Cependant, la taille des cristaux varie en fonction du solvant utilisé pour la laver. [3]

Enfin, la méthode d'analyse SEM permet d'examiner la morphologie des cristaux de l'hémozoïne ainsi que de la bêta-hématine [3,51,52]

#### 1.2.4 Évaluation *in vitro* de la formation d'hémozoïne

L'analogue synthétique de l'hémozoïne est la bêta-hématine. Cette dernière possède des propriétés spectrales et structurales similaires à celles de l'hémozoïne. [3] Toutefois, selon le protocole de synthèse, la taille et la forme des cristaux de la bêta-hématine synthétisée peuvent différer de celle de l'hémozoïne, engendrant des réponses inflammatoires variables lors de leur utilisation *in vitro* et *in vivo*. [53,54] Plusieurs protocoles de synthèse chimique de la bêta-hématine existent. [55,56] Dans ce travail, nous avons développé notre propre protocole de synthèse de la bêta-hématine, sur base de protocoles existants.

Afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques, les chercheurs étudient différentes caractéristiques de l'hémozoïne telles que sa structure et sa formation. Certaines thérapies agissent sur la formation de l'hémozoïne alors que d'autres interagissent avec l'hème. Les dérivés des quinoléines (chloroquine, quinine, méfloquine) auraient la capacité à recouvrir les cristaux d'hémozoïne, empêchant ainsi leur croissance et bloquant de ce fait la détoxification de l'hème.[57] L'artémisinine et ses dérivés pourraient créer un complexe avec l'hème libre, empêchant ainsi la conversion de cet hème toxique en hémozoïne.[58] Les mécanismes ne sont

---

<sup>21</sup> Rappelons que l'ensemble de ces dimères forment le cristal de l'hémozoïne.

toutefois pas complètement élucidés et sont complexes.

Une évaluation *in vitro* de la formation d'hémozoïne en présence de composés aux propriétés antipaludiques, permet d'étudier la capacité de ces composés à inhiber la voie de synthèse qui conduit à la polymérisation de l'hématine en bêta-hématine/hémozoïne. Ces évaluations *in vitro* permettront par analogie, de comprendre ce qu'il se passe physiologiquement au niveau du parasite.

Afin de déterminer quels composés inhibent potentiellement cette voie de détoxification, plusieurs protocoles ont été développés.

Selon Fitch et al. [59], la substance d'intérêt est mise en solution dans un milieu tamponné. A cette solution mise au bain à ultra-son, on ajoutera la quantité d'hématine nécessaire à l'obtention de la concentration voulue. Le volume doit également être ajusté à 2 mL. Après incubation, tout en étant mélangée, la solution d'hématine est centrifugée, lavée à l'aide de SDS 2,5% (m/v) dans un milieu tamponné avec du phosphate 50mM (pH 7.4). Le culot obtenu est mis en suspension dans un solvant composé de SDS 2,5% (pH 7.4) et du NaOH 0,01M est ajouté au précipité afin de le transformer.

La quantité d'hématine résiduelle et non transformée sera alors mesurée par spectrophotométrie.

Un autre protocole est celui décrit par Tripathi et al. [60] La première étape est la préparation d'une solution de 1 mL contenant de l'acétate de sodium (100mM, pH 4,8) avec 100  $\mu$ M d'hémine et un facteur<sup>22</sup> catalysant la synthèse d'hémine en bêta-hématine. Cette préparation est mélangée, incubée à 37°C pendant 12 à 14 heures. Elle sera alors centrifugée, lavée une première fois avec un tampon Tris-Hcl (100 mM, pH 7,8) en présence de SDS 2,5% (m/v) et une deuxième fois avec un tampon de bicarbonate (100 mM, pH 9,2). –

Le culot de bêta-hématine obtenu est solubilisé dans 50  $\mu$ L d'hydroxyde de sodium (2M) et dilué à 1 mL avec du SDS 2,5%.

La deuxième étape de son protocole consiste à ajouter un médicament, potentiellement inhibiteur de la formation de bêta-hématine, dans la solution décrite en début de protocole. Pour se faire, une solution stock du médicament (10mM) concerné est réalisée dans des solvants tels que l'eau, le diméthylsulfoxyde, l'éthanol. Cette solution stock est ajoutée juste après le tampon acétate, avant l'ajout d'hémine et du facteur catalysant. Le protocole poursuit ensuite les autres étapes décrites.

La quantité de bêta-hématine obtenue pourra dès lors être mesurée par absorbance à 400nm, témoignant de l'efficacité ou de l'inefficacité du médicament ajouté et étudié.

---

<sup>22</sup> Dans le cadre du protocole de Tripathi et al., plusieurs facteurs sont utilisés comme par exemple du plasma de souris infectés par *Plasmodium yoelii*.

Ces deux protocoles ont également été utilisés et adaptés par Afshar et al. pour l'étude de l'activité antimalarique d'extraits de plantes en mesurant, par absorbance à 400nm, la quantité d'hémozoïne obtenue. [61]

### 1.3. Découverte de nouveaux agents anti-malariques à partir de sources naturelles

De nombreuses molécules dont certaines d'origine naturelle sont actuellement utilisées comme traitement antipaludique: la chloroquine, la quinine, l'artémisinine et ses dérivés,...les deux premières étant extraites de l'écorce de *Cinchona officinalis*, la troisième étant extraite de l'*Artemisia annua*.

Il est recommandé par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) d'utiliser des thérapies combinées à base d'artémisinine ou un dérivé (artéméther + luméfantrine; dihydroartémisinine + pipéraquline; artésunate + amodiaquine; etc). [2]

Cependant, les parasites *Plasmodium* développent des résistances à l'artémisinine ou aux médicaments partenaires utilisés dans les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine. Par conséquent, des chercheurs étudient de nouvelles molécules ayant potentiellement une activité anti-malarique.

Dans le cadre de son travail de thèse, Mathilde Wells a évalué et a démontré l'activité antiplasmodique d'extraits bruts et de fractions isolées issues des venins de crapauds (*Rhinella marina* et *Incilius alvarius*). [62,63] En effet, ces venins contiennent des composés bioactifs tels que des bufadiénolides, des peptides, des alcaloïdes, des protéines, des amines biogènes et des bufotoxines [64] qui avaient déjà démontrés des propriétés antivirales [65], anti-tumorales [66], cytotoxiques [67], vasoconstrictrices et cardiotoniques [68,69]. La toxicité de ces venins vis-à-vis des GR, vecteurs des parasites, pourrait cependant représenter un obstacle à leur utilisation clinique. Un travail de recherche au Laboratoire d'Analyse Pharmaceutique (Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université de Mons) a démontré l'absence d'activité hémolytique des composés étudiés.[25]

Les venins de crapauds pourraient dès lors être la source de molécules potentiellement actives contre les parasites *Plasmodium* en remplacement de certaines devenues au cours du temps moins efficaces.

Dans ce contexte, il serait intéressant d'investiguer leurs modes d'action potentiels, y compris sur l'inhibition de la synthèse de l'hémozoïne.

## 2. Objectifs

Parmi les modes d'action connus des molécules anti-malariques, l'un d'eux est l'inhibition de la synthèse de l'hémozoïne. Dans ce contexte, des chercheurs travaillent sur la structure et les caractéristiques de l'hémozoïne dont l'analogue synthétique est la bêta-hématine.

Ce travail de recherche a pour objectif de développer une méthode de quantification de la bêta-hématine en LC-VIS.

Ceci pourra permettre, secondairement, à d'autres intervenants de tester *in vitro*, c'est-à-dire en l'absence du parasite, l'efficacité de leurs composés anti-malariques sur l'inhibition de la synthèse de l'analogue de l'hémozoïne, la bêta-hématine. Les nouvelles molécules à tester seraient dès lors évaluées lors d'un test de polymérisation de l'hémine en bêta-hématine, en présence d'un agent inducteur. La quantité de l'analogue de l'hémozoïne formée et quantifiée en LC-VIS, serait le témoin de l'action du composé testé sur cette synthèse et au de-là, mettrait en évidence un nouveau potentiel de l'agent anti malarique en identifiant son mode d'action.

### 3. Partie expérimentale

#### 3.1. Matériel et méthodes

##### 3.1.1 Réactifs chimiques, instruments de mesure

<b>Réactifs</b>	<b>Provenance</b>
NaOH, pellets a.r.	ChemLabs
Eau Ultra-pure (MiliQ)	Laboratoire d'Analyse Pharmaceutique, UMonS
MeOH, HPLC grade	ChemLabs
Acide acétique $\geq 99,8\%$	VWR
DMSO (Diméthylsulfoxyde)	Baker
TFA (Trifluoroacétique), 100%	VWR
Acétonitrile, HPLC gradient grade	ChemLabs
Hémine	Sigma-Aldrich
Hématine, porcine	Sigma-Aldrich
Bêta-hématine	Synthétisée par Orokia Traore
<b>Matériel</b>	<b>Provenance</b>
Micropipettes 20-200 $\mu$ L	BIOHIT
Micropipettes 100-1000 $\mu$ L	BIOHIT
Vials	BGB
Tubes 5mL	LLG-centrifuge
Flacons 15 mL	Greiner Bio one
Plot en Aluminium	Jeol Sem Cylinder Sample Stub
Cuvettes en polystyrène jetable	Fisherbrand <sup>TM</sup>
Filtre	Watherman <sup>TM</sup>
Vial avec septum	BGB
Colonne greffée C18	Waters
<b>Instruments</b>	<b>Provenance</b>
HPLC mode 1 (isocratique)	HPLC Hitachi D-7000
HPLC mode 2 (gradient)	HPLC Hitachi D-7000
FTIR	Perkin-Elmer
DLS	Malvern Zetasizer Nano ZS
SEM	JEOL scanning electron microscope
pH-meter 713	Metrohm
Balance	Mettler Toledo

### 3.1.2 Synthèse bêta-hématine

Plusieurs méthodes de synthèse existent. Deux protocoles ont été effectués et optimisés notamment en modifiant les concentrations de départ, les temps d'incubations,... Il est utile d'utiliser deux protocoles distincts afin de comparer les produits synthétisés et de s'assurer que le produit synthétisé correspond à de la bêta-hématine.

Dans le cadre de ces 2 protocoles, la bêta-hématine est synthétisée à partir d'hémine. Le premier protocole s'inspire de la méthode de synthèse selon Slater et al. [3,55] Le milieu réactionnel utilisé possède un pH acide proche de celui de la vacuole digestive du parasite. C'est-à-dire, un milieu réactionnel qui *in vivo* permet la biosynthèse de l'hémozoïne.

Dans ce protocole, la première réaction est l'oxydation de l'hémine en hématine suite à l'ajout d'hydroxyde de sodium. Ensuite, une solution d'acide propionique a été ajoutée à la solution afin d'acidifier le pH à 4 et de créer un milieu réactionnel propice à la formation de cristaux de bêta-hématine. Pour permettre la formation des cristaux bruns, la solution est incubée à 70°C pendant 18 heures. Ensuite, la bêta-hématine synthétisée est lavée à l'eau Mili-Q et séchée à 37°C pendant 72 heures. Les cristaux sont broyés au mortier. Enfin, la bêta-hématine sous forme de poudre est lavée dans un tampon de bicarbonate pendant 3 heures puis 3 fois à l'eau Mili-Q et séchée à 37 °C sur papier filtre pendant 24 heures. Cet analogue chimique de l'hémozoïne est alors conservé à 4°C dans un flacon brun. [3,55,70,71]

#### Protocole détaillé n°1:

10 mL d'une solution basique (NaOH, hydroxyde de sodium 0,4M)<sup>23</sup> ont été ajoutés à 0,3018g d'hémine. Ensuite, le pH de cette solution est ajusté à 4 à l'aide d'acide propionique 2%<sup>24</sup>. La solution préparée est placée dans des flacons afin de l'incuber au bain marie à 70°C.

Après une incubation de 18h, un culot s'est formé et est lavé six fois avec de l'eau Mili-Q par centrifugation à 1000g pendant 5 minutes. Le culot obtenu est séché pendant 72 heures à l'étuve ce qui permet l'obtention de cristaux qui vont être broyés au mortier en porcelaine.

La poudre obtenue est lavée dans un tampon de bicarbonate pH 9,2<sup>25</sup> pendant 3h, sous agitation

---

<sup>23</sup> Préparation NaOH 0,4M: 0,4g dans 25mL d'eau Mili-Q.

<sup>24</sup> Préparation de l'acide propionique: 2mL d'acide propionique 99,5% ad 100mL d'eau Mili-Q.

<sup>25</sup> Préparation du tampon de bicarbonate:

$m_{\text{NaHCO}_3} = 16,8\text{g}$  dans 1L

$m_{\text{Na}_2\text{CO}_3} = 2,0596\text{g}$  dans 100mL.

Sous agitation magnétique constante: ajouter 175mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,2M à 935 mL de NaHCO<sub>3</sub> 0,2M. Le pH obtenu est de 9,203. Sous agitation magnétique constante : ajouter 175mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,2M à 935 mL de NaHCO<sub>3</sub> 0,2M. Le pH obtenu est de 9,203.

magnétique. Cette solution sera ensuite centrifugée à 1000g pendant 5 minutes. Le culot ainsi formé est lavé à l'eau Mili-Q trois fois puis récupéré sur du papier filtre et séché à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

#### Protocole détaillé n°2:

Le second protocole consiste en l'utilisation d'une solution stock d'hémine<sup>26</sup> en présence d'eau Mili-Q, de Tween 20 à une concentration de 0,075 g/mL<sup>27</sup> dissout dans l'eau et d'une solution tampon d'acétate permettant d'acidifier le pH à 4,8. Quant au Tween 20<sup>®</sup>, il permet d'accélérer la formation d'hémine en bêta-hématine.

Afin de préparer cette solution, une certaine masse d'hémine est dissoute dans un volume de DMSO (Diméthylsulfoxyde) afin d'obtenir une concentration de 0,15g/mL. 1 mL de cette préparation est prélevée et placée dans un flacon afin d'y ajouter 1mL d'eau Mili-Q, 1 mL de Tween 20<sup>®</sup> et 7 mL de tampon acétate 100mM<sup>28</sup>.

Ensuite, la préparation est ultrasoniquée jusqu'à dissolution complète de l'hémine. Puis, il y a incubation dans le noir à 37°C pendant 24 heures et à température ambiante pendant 1h. La solution est lavée 3 fois à l'eau Mili-Q par centrifugation à 1000g pendant 5 minutes. Le culot récupéré est séché une dernière fois à l'étuve à 37°C pendant 24h ou plus si nécessaire. [72,73]

### 3.1.3 Caractérisation

Une fois l'analogue du pigment malarique synthétisé selon les deux protocoles, il était intéressant de l'identifier ainsi que de le caractériser à l'aide de différentes méthodes.

#### 3.1.3.1 FT-IR (Fourier-Transform Infrared Spectroscopy)

La première étape a été d'identifier les produits cristallins synthétisés en FT-IR (Fourier-Transform Infrared Spectroscopy). La méthodologie d'acquisition des spectres FT-IR est décrite ci-dessous.

Les mesures par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR) ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre Perkin Elmer Spectrum 100 (attenuated total reflectance, ATR-FT-IR, Manchester, Royaume-Uni). Les analyses ont été effectuées sur des échantillons en phase solide

---

<sup>26</sup> Hémine dans DMSO

<sup>27</sup> Polysorbate de nature hydrophile. C'est un tensioactif non-ionique [52]

Tween 20 à une concentration de 0,075 g/mL: ajouter 0,15g de Tween 20 dans 2mL d'eau Mili-Q. Prélever 1mL de solution de Tween 20 dans le falcon.

<sup>28</sup> Préparer un tampon acétate 100mM pH 4,8 :

Dans un ballon jaugé de 1L, ajouter une masse de 13,608g d'acétate de sodium trihydraté. Ajouter 500 mL d'eau Mili-Q. Ensuite, il faut ajouter 5,7742 mL d'acide acétique glacial. Mettre à trait avec de l'eau Mili-Q et vérifier le pH.

pour une gamme spectrale comprise entre 4000 et 650  $\text{cm}^{-1}$  et les spectres sont présentés en pourcentage en transmittance. [74]

#### Protocole:

Après avoir lavé la presse à embout plat et le cristal avec du méthanol, un background a été réalisé. Le background permet de soustraire le bruit de fond ou « absorptions parasites » des spectres des échantillons analysés.

Chacun à leur tour, une pointe de spatule d'échantillons sous forme de poudre a été placée sur le cristal<sup>29</sup> et a été analysée via le mode ATR du spectromètre Perkin Elmer Spectrum 100. Le cristal et la presse à embout plat sont nettoyés 2 fois au méthanol entre chaque analyse d'échantillons afin d'éviter des contaminations croisées.

#### 3.1.3.2 SEM (Scanning Electron Microscope)

Après avoir identifié les produits de synthèses en FTIR, il est possible de caractériser les différentes porphyrines en générant des images à haute résolution de leur structure via une microscopie électronique à balayage.

#### Protocole:

Les quatre échantillons (bêta-hématine du protocole 1, bêta-hématine du protocole 2, hémine, hématine porcine) seront analysés deux fois.

Chacun d'entre eux a d'abord été analysé en SEM<sup>30</sup> (Jeol scanning electron microscope, Service de Biologie des Organismes Marins et Biomimétisme-UMons) sans qu'ils soient métallisés<sup>31</sup>. [75,76]

Nous avons procédé à une deuxième analyse. Les cinq échantillons ont été métallisés afin d'obtenir les meilleures résolutions possibles.

Pour les deux analyses, les échantillons de bêta-hématine du protocole 1 et 2, d'hémine et d'hématine porcine ont été micronisés au pilon dans un mortier afin d'avoir une poudre et des particules suffisamment fines et de taille homogène. Une pointe de spatule de chaque échantillon est placée en fine couche sur un « disque adhésif conducteur carbone<sup>32</sup> double face ».

Le disque adhésif est placé sur un plot ou « JEOL SEM Cylinder Sample Stub » constitué

---

<sup>29</sup> Le cristal en FT-IR est le détecteur.

<sup>30</sup> Scanning Electron Microscope permet la production d'images à très hautes résolution de la structure des échantillons. Le principe utilisé lors de cette microscopie électronique est l'interaction électron-matière.

<sup>31</sup> Une fine couche de métal (platine ou or) est appliquée sur l'échantillon. Elle permet d'augmenter la conductivité de l'échantillon. Dans le cas d'échantillons non-conducteurs, les électrons s'accumulent à la surface de l'échantillon ce qui crée des régions très lumineuses. Ces régions lumineuses peuvent apparaître sur les images résultantes.

<sup>32</sup> Le carbone est un conducteur électrique

d'aluminium<sup>33</sup> et cela pour les quatre échantillons. [77]

Les stubs sont placés dans le support et celui-ci est immédiatement inséré dans la chambre de l'instrument où le vide sera fait pour ensuite analyser les différents échantillons. A cette étape, des paramètres d'observation sont choisis tels que le voltage, le zoom, le Working Distance (WD).

Le voltage (kV) est de 1.00 kV pour l'hémine ; 2.00 kV pour l'hématine porcine, la bêta-hématine du protocole 1 et la bêta-hématine du protocole 2. Le voltage est automatiquement modifié selon l'échantillon analysé.

Plusieurs zoom ont été utilisés (45x, 90x, 180x) mais seules les photos prises avec un zoom de 180x sont présentées dans ce travail. Une partie des photos est également reprise en annexe.

Le Working Distance varie selon l'échantillon afin de faire le focus sur l'échantillon.

Il était également intéressant de modifier le contraste et la brillance lors de l'analyse de chaque échantillon. En effet, ces deux paramètres permettent d'améliorer la qualité de l'image.

Enfin, lorsque tous les paramètres sont sélectionnés, le mode « Freeze » est activé afin de capturer l'image comme on la souhaite.

Dans le but d'analyser des échantillons métallisés, nous avons procédé comme suit : les échantillons ont d'abord, été micronisés puis placés sur un « disque adhésif conducteur carbone » collé sur un stub en aluminium, comme décrit dans le protocole des échantillons non-métallisés. Ils sont ensuite métallisés par une fine couche d'or<sup>34</sup>. Afin de procéder à cette métallisation, les stubs sont placés dans un support. Celui-ci doit être placé de sorte que les échantillons soient vers le bas.

Une fois la métallisation des différents échantillons réalisée, les stubs sont placés dans le support de la SEM et sont analysés en suivant les mêmes étapes que dans le protocole de la première analyse.[78]

Un blanc a également été réalisé lors de l'analyse des échantillons métallisés.

Pour se faire, il suffit de coller un « disque adhésif conducteur carbone » vierge sur un stub et de le placer dans le support de la SEM. Le blanc est analysé de la même manière que les autres échantillons.

### 3.1.3.3 DLS (Dynamic Light Scattering)

La dernière technique de caractérisation des hémoprotéines est la DLS (Dynamic Light Scattering)<sup>35</sup>. Elle permet de déterminer par des mesures de diffusion dynamique de la lumière,

---

<sup>33</sup> L'aluminium est également un bon conducteur électrique.

<sup>34</sup> Cette fine couche est issue d'une pulvérisation cathodique.

<sup>35</sup> « C'est une technique qui mesure la vitesse des particules qui subissent les mouvements Browniens. » [79]

la taille hydrodynamique<sup>36</sup> des particules en suspension. Les tailles hydrodynamiques des particules en suspension sont enregistrées sur un analyseur de taille Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, laser He-Ne, 633 nm) (Worcestershire, Royaume-Unis). [79]

#### Protocole :

Une solution stock des quatre produits (hémine, hématine porcine, bêta-hématine du protocole 1, bêta-hématine du protocole 2) est préparée à une concentration de 10mg/mL. Pour réaliser les quatre solutions stocks, chaque échantillon a été solubilisé dans du NaOH 0,4M. Ces solutions stocks sont ensuite diluées dans du NaOH 0,4M afin d'obtenir des concentrations de 1mg/mL, 0,5mg/mL et 0,25mg/mL. On parle alors de suspensions aqueuses diluées possédant un pH alcalin.

La DLS nécessite ensuite d'être paramétrée. Pour se faire, un indice de réfraction de la bêta-hématine a été défini à 1,44 à une longueur d'onde de 635 nm, comme reporté dans la littérature. [80] Il est également important de définir une absorbance et une température d'analyse. Celles-ci sont respectivement 0,0 et 25°C.

Enfin, chaque suspension aqueuse est placée dans une cuvette en polystyrène jetable afin d'être analysée. Les données obtenues sont présentées sous forme de distributions du diamètre hydrodynamique et de valeurs moyennes (diamètre hydrodynamique,  $D_H \pm$  écart type).

### 3.1.4 Développement LC-VIS

#### 3.1.4.1 Solvants de solubilisation

En premier lieu, des tests de solubilisation de la bêta-hématine ont été effectués afin de la solubiliser de façon à pouvoir injecter la solution de bêta-hématine en HPLC-VIS et ainsi de permettre sa quantification.

Il est essentiel de trouver un solvant qui peut être injecté dans l'HPLC sans que la bêta-hématine ne précipite en présence de ce solvant.

#### Protocole des tests de solubilisation :

Dans ces tests de solubilisation, nous avons utilisé des solvants de solubilisation (hexane et hydroxyde de sodium) ainsi que des solvants de dilution (méthanol et eau Mili-Q).

Plusieurs essais de mise en solution de bêta-hématine (protocole 1 et 2) ont été réalisés avec de l'hexane. Des solutions de 1mg/mL ; 0,5mg/mL ; 0,25 mg/mL ; 0,1 mg/mL ; 0,01 mg/mL de

---

<sup>36</sup> On tient compte de la particule et de la coque de solvatation (les molécules d'eau adsorbées à la surface de la particule). Le diamètre hydrodynamique est noté  $D_H$  et est mesurée en nm.

bêta-hématine 1 et 2 ont été préparées afin de détecter si la bêta-hématine est soluble dans l'hexane. De cette façon, ces solutions pourraient être injectées en HPLC.

Selon la littérature, la bêta-hématine est soluble dans du NaOH. [3] Une solution stock de bêta-hématine 1 est alors préparée à partir de 1mg de bêta-hématine solubilisée dans 1 mL de NaOH 0,4M. Cette solution stock a ensuite été diluée dans du MeOH (0,5mg/mL ; 0,25mg/mL ; 0,1 mg/mL ; 0,01 mg/mL) de façon à diminuer le pH de la solution et par conséquent, permettre l'injection de bêta-hématine en HPLC si celle-ci ne précipite pas lors de l'ajout du solvant de dilution. Cette étape a également été réalisée avec la bêta-hématine du protocole 2.

La troisième étape de ces tests consiste en la dilution des deux solutions stocks de bêta-hématine 1 et 2 avec de l'eau Mili-Q. Quatre concentrations sont obtenues : 0,5mg/mL ; 0,25mg/mL ; 0,1 mg/mL ; 0,01 mg/mL. Afin de pouvoir injecter ces solutions en HPLC, le pH doit être suffisamment bas et la bêta-hématine doit toujours être solubilisée.

Enfin, la solubilisation de l'hémine ainsi que de l'hématine porcine ont également été vérifiées. Selon le protocole décrit ci-dessus, l'hémine ainsi que l'hématine porcine ont chacune été solubilisées dans de l'hydroxyde de sodium 0,4M. Les solutions stocks à 10 mg/mL d'hémine ainsi que d'hématine porcine ont ensuite été diluées dans du MeOH HPLC grade afin d'obtenir les cinq concentrations souhaitées (1 mg/mL ; 0,5 mg/mL ; 0,25 mg/mL ; 0,1 mg/mL ; 0,01 mg/mL).

Ces mêmes solutions stocks d'hémine et d'hématine porcine ont également été diluées dans de l'eau déminéralisée (eau Mili-Q) dans le but de réaliser les cinq concentrations décrites ci-dessus.

#### 3.1.4.2 Phases mobiles

Des essais de phases mobiles ont été réalisés dans le but de vérifier que les solvants des phases mobiles ne provoquent pas la précipitation des échantillons.

##### Protocole des essais de phases mobiles :

Trois solutions stocks à 10µg/mL ont été préparées en solubilisant chaque composé dans de l'hydroxyde de sodium 0,4M: une solution stock de bêta-hématine, une solution stock d'hémine et une solution stock d'hématine porcine. A partir de ces trois solutions stocks, des échantillons de concentrations différentes (2µg/mL ; 1µg/mL ; 0,5 µg/mL ; 0,25 µg/mL ; 0,2 µg/mL) ont été préparés en diluant chaque solution stock dans du méthanol ou dans de l'eau Mili-Q. [81,82,83] Les échantillons seront mis en présence de chaque solvant qui compose les phases mobiles afin

d'exclure toute précipitation.

Sur base de la littérature, nous prévoyons de tester plusieurs phases mobiles mais seule la première phase mobile sera utilisée en HPLC-VIS [81,82] :

1. Méthanol / Eau Mili-Q / Acide acétique (32 :18 :5)
2. 0,1% acide trifluoroacétique (v/v) dans de l'acétonitrile  
Préparation : 1  $\mu$ L de TFA + 999  $\mu$ L d'ACN
3. 0,1% acide trifluoroacétique (v/v) dans l'eau Mili-Q  
Préparation : 1  $\mu$ L de TFA + 999  $\mu$ L d'eau Mili-Q
4. 0,05% acide trifluoroacétique (v/v) dans l'acétonitrile  
Préparation : 0,5  $\mu$ L de TFA + 999,5  $\mu$ L d'ACN

Chaque échantillon a été testé avec chacun des mélanges de solvants cités ci-dessus, composant les phases mobiles. De plus, les solvants composant ces phases mobiles (méthanol, eau Mili-Q, acide acétique, TFA, acétonitrile) ont été testés séparément afin de s'assurer que les échantillons ne précipitent pas au sein de ces solvants pris séparément.

#### 3.1.4.3 Développement et optimisation de la méthode LC-VIS

L'étape suivante a été celle de l'injection de bêta-hématine en HPLC-VIS afin de la quantifier. Dans ce but, il faut optimiser un protocole permettant de doser ce composé de la façon la plus quantitative possible. Il est donc important de trouver le bon mode (isocratique ou gradient), la phase mobile la plus adaptée ainsi que la bonne concentration des échantillons.

Étant donné que peu de données sont disponibles dans la littérature, plusieurs modes ont été explorés : en isocratique et en gradient ainsi que plusieurs phases mobiles et différentes concentrations d'échantillons.

##### Protocole de l'injection des échantillons en mode isocratique :

Plusieurs tests en mode isocratique ont été réalisés. Pour ces différents tests, les échantillons sont détectés à une longueur d'onde ( $\lambda$ ) de 395 nm. La phase stationnaire est une colonne de silice greffée C18 possédant une longueur de 25 cm, un diamètre de 4,6 mm et un diamètre de particules de 5  $\mu$ m. La phase mobile initialement utilisée pour les trois premiers tests est un mélange de méthanol, d'eau Mili-Q et d'acide acétique (256 : 144 : 40 v/v). Elle sera ensuite remplacée par une seconde phase mobile qui est un mélange d'eau Mili-Q, de méthanol et d'acide formique (75 : 25 : 0,1 v/v)

Les échantillons sont réalisés à partir d'une solution de bêta-hématine dissoute dans du NaOH 0,4M (solution stock); cette solution est ensuite diluée dans de l'eau déminéralisée ou dans du méthanol. Deux échantillons sont préparés à partir de la solution stock diluée dans du méthanol afin d'obtenir une concentration de 2 µg/mL et de 250 µg/mL, soit un échantillon dans la gamme des basses concentrations et un échantillon dans les hautes concentrations. Deux autres échantillons de 2 µg/mL et 250 µg/mL sont également préparés à partir de la solution stock qui, cette fois, sera diluée dans de l'eau Mili-Q.

Les échantillons à une concentration de 2 µg/mL seront injectés en premiers et seront suivis des échantillons à une concentration de 250 µg/mL.

Avant l'injection de chaque échantillon, un blanc est injecté. Le blanc réalisé avant les échantillons dilués dans du méthanol est constitué de NaOH 0,4M et de méthanol alors que le blanc injecté avant les échantillons dilués dans de l'eau ultra-pure est constitué de NaOH 0,4M et d'eau Mili-Q. Les proportions NaOH/MeOH ou NaOH/H<sub>2</sub>O<sub>(distillée)</sub> sont calculées de façon à obtenir la même concentration que l'échantillon ultérieur au blanc injecté.

Sans être certain que des particules de de tailles différentes ne soient présentes dans la solution stock de bêta-hématine et ne faussent les résultats, la solution stock de bêta-hématine a été filtrée (Whatman™ Syringe Filter, Puradisc 25 H-PTFE Disposable Filter Device) avant d'être diluée dans du méthanol HPLC grade afin de réaliser 4 échantillons de 100 µg/mL ; 111,11 µg/mL et 125 µg/mL ; 250 µg/mL. Ces quatre échantillons filtrés sont analysés dans les conditions initialement décrites. Chaque échantillon injecté est séparé par un blanc tel que décrit ci-dessus.

Sans être certain que des résidus d'hémine, d'hématine ne soient présents dans la solution stock de bêta-hématine, puisqu'ils sont les précurseurs de la bêta-hématine, et ne faussent les résultats, un dernier test est réalisé dans les conditions initialement décrites. Des échantillons de bêta-hématine, d'hémine et d'hématine porcine à une concentration de 100 µg/mL sont préparés à partir de leur solution stock diluée dans du méthanol HPLC grade et analysés.

La phase mobile , initialement utilisée en mode isocratique, méthanol, eau Mili-Q, acide acétique (256 : 144 : 40 v/v) est ensuite remplacée par un mélange d'eau Mili-Q, de méthanol et d'acide formique (75 : 25 : 0,1 v/v) toujours dans un mode isocratique. Les échantillons sont détectés à une longueur d'onde ( $\lambda$ ) de 395 nm et la phase stationnaire reste identique.

Les échantillons de bêta-hématine, d'hémine et d'hématine à une concentration de 100 µg/mL seront injectés dans ce système et seront élués par la nouvelle phase mobile durant un temps de run de 40 minutes.

### Protocole de l'injection des échantillons en mode gradient :

Une autre façon d'optimiser les résultats, serait de changer de mode. On passe alors d'un mode isocratique à un mode en gradient. Deux gradients seront testés. La longueur d'onde utilisée pour l'analyse des échantillons est également de 395 nm.

Pour le premier gradient testé, la phase mobile testée est composée du solvant A qui correspond à un mélange d'eau Mili-Q avec 0,1% d'acide acétique et du solvant B qui est uniquement du méthanol HPLC grade. **(Tableau 2.)**

Un deuxième gradient sera également testé. **(Tableau 3)** Il se différencie essentiellement du premier par son temps d'analyse plus long. La phase mobile testée reste composée des mêmes solvants A et B.

*Tableau 2. Tableau reprenant la phase mobile (solvants A et B) injectée en gradient.*

Temps (minutes)	Solvant A (eau/Acide acétique 0,1% )	Solvant B (MeOH)
0	95	5
2	95	5
25	0	100
30	0	100
32	95	5
35	95	5

**Tableau 3.** Tableau reprenant la phase mobile (solvants A et B) injectée en gradient.

Temps (minutes)	Solvant A (eau/Acide acétique 0,1% )	Solvant B (MeOH)
0	95	5
2	95	5
25	0	100
35	0	100
37	95	5
40	95	5

Quatre échantillons ont été préparés à partir d'une solution stock d'hémine, d'hématine porcine, de bêta-hématine et de bêta-hématine anciennement synthétisée par TraoreO. [3] Chacun a été dilué dans du méthanol afin de préparer les échantillons à une concentration de 100 µg/mL. Chaque échantillon est injecté après l'injection d'un blanc composé de NaOH 0,4M et de méthanol HPLC grade. Les échantillons sont injectés selon le gradient décrit dans le **Tableau 2** puis selon le gradient décrit dans le **Tableau 3**; les solvants A et B de la phase mobile restant identiques.

La dernière étape avant d'effectuer une droite de calibration consiste à éviter le carry-over. Ce dernier fut évalué en injectant un échantillon blanc constitué d'hydroxyde de sodium 0,4M et de méthanol (50 : 50) juste après l'injection du standard de calibration le plus concentré. Et ce, afin d'éluer tous les résidus éventuels d'échantillon qui seraient restés dans le système de l'HPLC.

La phase mobile testée reste composée des mêmes solvants A et B injectés selon le gradient décrit au **Tableau 3**.

Un échantillon de solution stock de bêta-hématine dilué dans du méthanol à une concentration de 100 µg/mL est injecté et détecté. Ensuite, un blanc composé d'hydroxyde de sodium 0,4M et de méthanol est injecté ; cette opération est répétée de manière à diminuer le carry-over.

Un autre essai d'optimisation de blanc a été réalisé. L'échantillon de bêta-hématine a été injecté à un gradient tel que représenté au **Tableau 3**. Plusieurs blancs seront injectés en isocratique

avec une phase mobile de méthanol HPLC grade avant d’injecter un dernier blanc mais, cette fois, injecté au même gradient que pour l’échantillon de bêta-hématine. (**Tableau 3.**)

Enfin, de façon à vérifier que tous les paramètres de l’HPLC permettraient de quantifier la bêta-hématine, des droites de calibration ont été réalisées. Une méthode de quantification de la bêta-hématine serait alors développée et permettrait d’envisager la mise au point d’un test *in vitro* qui ne requiert pas la présence de parasite. Les molécules à tester seraient alors évaluées lors d’un test de polymérisation de l’hémine en bêta-hématine en présence d’un agent inducteur. La quantité de l’analogue de l’hémozoïne formé, serait témoin de l’action du composé testé sur cette synthèse et au de-là de mettre en évidence un nouveau potentiel agent anti malarique, identifierait son mode d’action.

Deux droites de calibration ont été réalisées en utilisant le même gradient. (**Tableau 3.**) Cependant, le nombre de blancs varie en fonction des concentrations des échantillons de bêta-hématine échelonnées de 0,01 µg /mL à 150 µg /mL. (**Figure 18.**)

### 3.2. Résultats et discussion

#### 3.2.1 Synthèse de la bêta-hématine

Le premier protocole de synthèse de la bêta-hématine a permis d’obtenir un rendement moyen de  $(44 \pm 2)\%$ . (**Tableau 4.**)

**Tableau 4..** Tableau reprenant les rendements en bêta-hématine obtenus lors de la réalisation du protocole 1. Le rendement en bêta-hématine est de  $(44 \pm 2)\%$ .

Essais	Masse <sub>hémine</sub> (g)	Masse <sub>bêta-hématine</sub> (g)	Rendement (%)
1	0,3012	0,1268	42,0983
2	0,6032	0,2708	44,8939
3	0,6004	0,2714	45,2032
		Moyenne (%)	44,0651
		Ecart-type (%)	1,7103

Un deuxième protocole a été réalisé afin de pouvoir comparer les deux produits obtenus mais également dans le but de synthétiser plus de bêta-hématine.

Ce deuxième protocole a été optimisé en augmentant les temps d’incubation à l’étuve ainsi qu’en augmentant les concentrations de départ. Grâce à ce protocole n°2, il a été possible d’obtenir un rendement moyen de  $(60 \pm 4)\%$ . (**Tableau 5.**) [83]

**Tableau 5.** Tableau reprenant les rendements en bêta-hématine obtenus lors de la réalisation du protocole 2. Le rendement en bêta-hématine est de  $(60 \pm 4)\%$ .

Essais	Masse <sub>hémimine</sub> (g)	Masse <sub>bêta-hématine</sub> (g)	Rendement (%)
1	0,1531	0,0975	64,8703
2	0,1500	0,0878	58,5333
3	0,1499	0,0865	57,7051
		Moyenne (%)	60,3696
		Ecart-type (%)	3,9120

### 3.2.2 Caractérisation

#### 3.2.2.1 FT-IR

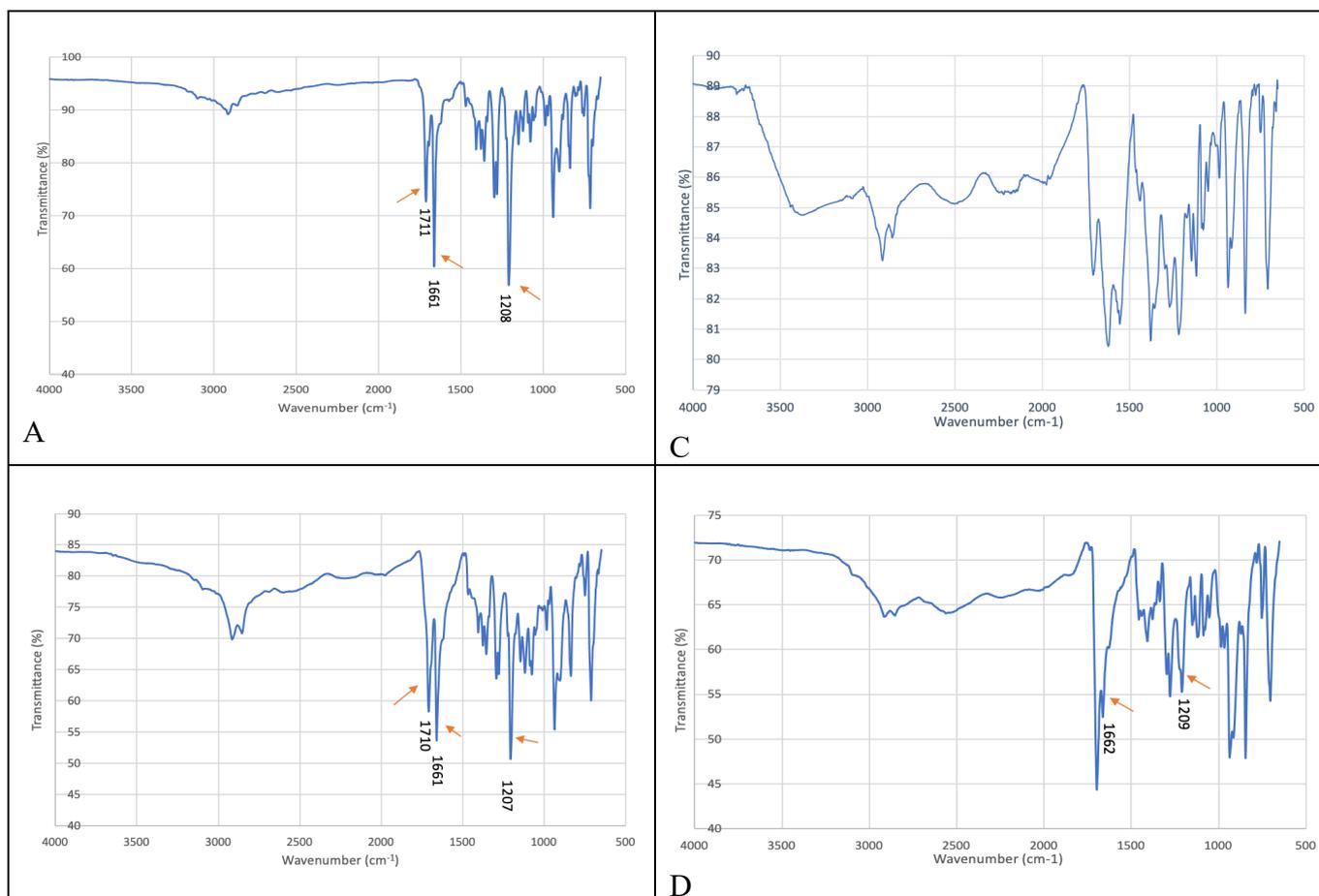
La spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier (FT-IR) est une technique couramment utilisée dans le cadre de la caractérisation de protoporphyrines. Cette étape permet d'identifier et de comparer les produits de synthèse issus des deux protocoles sélectionnés. De plus, les spectres IR des précurseurs de la synthèse (hémimine et hématine) furent établis afin de confirmer que le produit de fin était bel et bien différent du réactif de départ.

L'analyse structurale des hémoprotéines en IR s'étend de  $3500 \text{ cm}^{-1}$  à  $500 \text{ cm}^{-1}$ . Les bandes d'absorption caractéristiques de la bêta-hématine obtenues en IR sont respectivement  $1210 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1661 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1710 \text{ cm}^{-1}$ . Chaque bande traduit la vibration d'une liaison au sein du cristal. La bande à une longueur d'onde de  $1210 \text{ cm}^{-1}$  correspond à la liaison C-O du carboxylate alors que le pic à  $1661 \text{ cm}^{-1}$  correspond à la vibration de la liaison entre ce même carboxylate et l'atome de fer situé au centre du cristal. Quant aux liaisons hydrogènes permettant la formation de la bêta-hématine, liaisons reliant les dimères entre eux, elles sont caractérisées par le pic à une longueur d'onde de  $1710 \text{ cm}^{-1}$ . On retrouve ces trois bandes sur le spectre du produit synthétisé à l'issue des deux protocoles décrits. Ceci témoigne d'une part, qu'il s'agit de la même molécule analysée dans les protocoles 1 et 2. D'autre part, il s'agirait bien de bêta-hématine. (**Figure 7. (A) ; (B)**)

Afin de s'assurer du bon déroulement des deux synthèses de l'analogue de l'hémozoïne, il est intéressant de comparer les spectres IR des produits synthétisés à leurs précurseurs, l'hémimine et l'hématine. Ces deux précurseurs ont un spectre bien distinct de celui de la bêta-hématine. (**Figure 7. (C) ; (D)**) En effet, la position, l'intensité ainsi que la forme des bandes sur les spectres de l'hémimine et de l'hématine porcine, sont différentes de celles présentes sur les

spectres de la bêta-hématine. Il y a absence des pics à  $1661\text{ cm}^{-1}$  et  $1208\text{ cm}^{-1}$  chez l'hématine porcine et l'intensité des bandes de l'hémine est plus faible que l'intensité des bandes de la bêta-hématine. (**Figure 7. (C) ; (D)**)

Il serait donc possible de conclure que la molécule de synthèse obtenue au protocole 1 et au protocole 2 serait de la bêta-hématine et ne correspondrait ni à de l'hémine ni à de l'hématine porcine. [3,50,84]



**Figure 7.** Spectre IR de la bêta-hématine synthétisée à partir du protocole numéro 1 (A), de la bêta-hématine synthétisée à partir du protocole numéro 2 (B), de l'hématine porcine (C), de l'hémine (D).

### 3.2.2.2 Microscopie à balayage électronique

La microscopie à balayage électronique communément appelée SEM (= Scanning Electron Microscopy) permet d'observer la morphologie et la taille des cristaux de bêta-hématine formée; cette technique permet donc d'obtenir une idée approximative de grandeur des composés analysés. Les échantillons non-métallisés lors de la première mesure ont été analysés à la même échelle: les images ont été prises avec le même zoom (x180). (**Figure 8**) Les échantillons analysés ont été secondairement métallisés afin de faciliter la capture des images

en supprimant le mouvement présent spontanément dans les échantillons non-métallisés. De plus, la métallisation permettrait de diminuer les régions lumineuses sur l'image en augmentant la conductivité de l'échantillon. Elle permettrait également d'améliorer la netteté de l'image. En effet, dans le cas d'échantillons non-conducteurs, les électrons s'accumulent à la surface de l'échantillon ce qui crée des régions très lumineuses. Quant à l'eau présente dans l'échantillon, elle s'évapore dans la chambre d'observation dû à la faible pression. Cette évaporation va flouter l'objectif et peut de cette façon, diminuer la netteté de l'image.

Cependant, malgré l'étape de métallisation, les images obtenues n'étaient toujours pas nettes et étaient toujours caractérisées par la présence de régions lumineuses à la surface des cristaux de bêta-hématine. La métallisation des échantillons a uniquement permis de faciliter la capture des images des cristaux présents dans les différents échantillons sans toutefois supprimer les régions lumineuses à la surface des cristaux et sans améliorer la netteté de l'image. Un problème expérimental de paramétrage du contraste est donc à envisager plutôt qu'un problème de conductivité et de présence d'eau dans l'échantillon. [75] **photos A,B,C de la Figure 8.**

#### ***(Annexe1)***

La morphologie et la taille des cristaux synthétisés dans nos différents protocoles diffèrent de ce qui est habituellement décrit dans la littérature. (**Figure 8, Annexe 1**) [3,52,55,85,86,87] Les cristaux de bêta-hématine synthétique et d'hémozoïne, bien qu'ils soient isostructuraux, présentent à l'imagerie des différences dans la morphologie des cristaux. Les cristaux d'hémozoïne sont remarquablement uniformes en taille et forme. Ils ont une morphologie parallélépipédique et une taille de l'ordre de 800x200x200 nm. [87] Leurs bords sont pointus et tranchants; caractéristiques de cristallinité. [85] Différents protocoles de synthèse de la bêta-hématine ont produit du matériel diversifié, pouvant être faiblement cristallin et hétérogène au sein du même échantillon produit. [55] La forme et la taille des cristaux peuvent différer selon le protocole de synthèse de la bêta-hématine. [88] Il a néanmoins été montré que la cristallisation de l'hématine dans un milieu aqueux donnait rarement lieu à une surface de cristal lisse et pourvue de bords pointus mais plutôt à des cristaux rugueux ; leur surface étant grêlée de formations rugueuses quasi sphériques. A l'opposé, la cristallisation de l'hématine dans un milieu qui mime l'environnement lipidique tel qu'on peut le rencontrer dans la vacuole digestive des parasites, donnera des cristaux très similaires à ceux extraits des parasites, c'est-à-dire plus uniformes, lisses et pointus. [85]

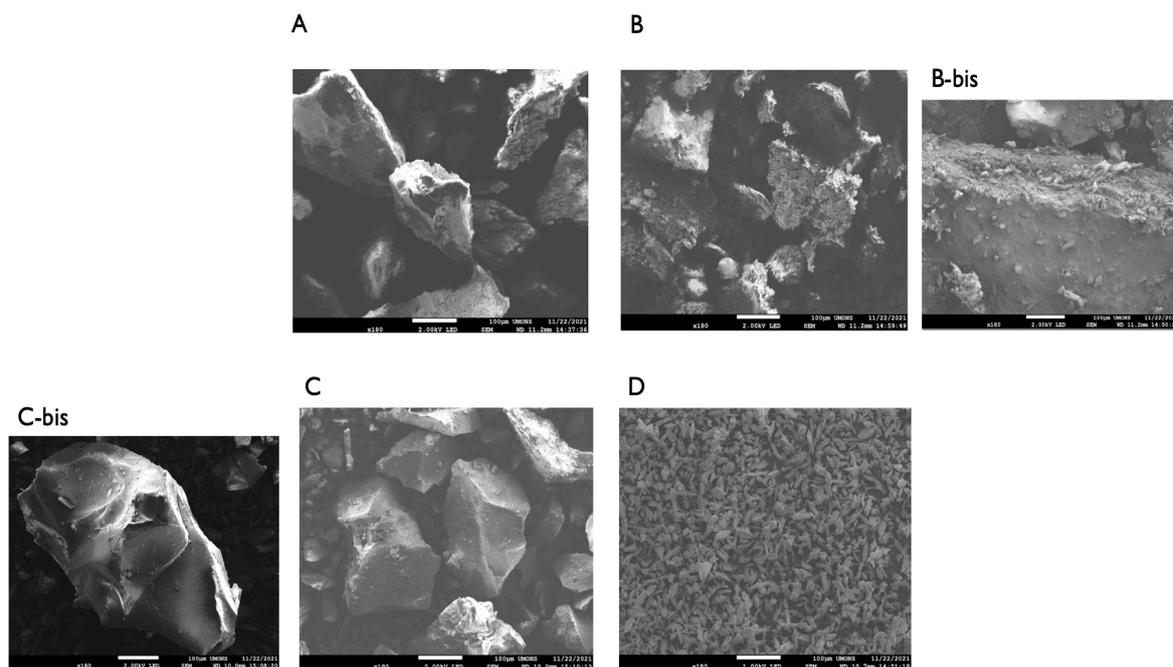
Les structures observées pour nos deux protocoles de synthèse, après micronisation, sont de taille bien supérieure à ce que l'on décrit dans la littérature ; leur taille étant de l'ordre de 200  $\mu\text{m}$ . Ces structures revêtent en outre, un aspect irrégulier, non cristallin et plutôt amorphe. On peut cependant observer à leur surface, la présence de nombreuses petites irrégularités. Ces

structures pourraient être des agrégats amorphes de bêta-hématine, revêtant à leur surface de petits cristaux ou des petits dépôts amorphes. (*Figure 8, Annexe 1*)

Un agrandissement de ces petites irrégularités de surface aurait peut-être pu démontrer leur nature cristalline. On peut également remarquer que les structures observées en SEM pour nos deux protocoles de synthèse, sont assez similaires à ce qui avait été observé par Traore.O., identifié comme bêta-hématine.[3] (*Annexe 1*)

Les échantillons métallisés quant-à-eux montrent une taille de ces structures amorphes inférieure à celle des structures observées dans les échantillons non-métallisés; la micronisation dans un mortier ou au bain à ultrason ayant été réalisée plus longtemps.

Cependant, sur base de nos observations en SEM, il est impossible de déduire que nous avons bien produit grâce aux protocoles 1 et 2, de la bêta-hématine. Nous pouvons cependant affirmer que les structures observées en SEM sont le résultat de la micronisation de plus grosses structures ; l'aspect cristallin de ces structures avant micronisation n'a pas été examiné. Après micronisation, leur aspect ne revêt pas l'aspect de cristaux.



**Figure 8** Images à haute résolution des porphyrines. **A** : Bêta-hématine protocole 1. Taille : 250µm- 167µm  
**B** : Bêta-hématine protocole 2. Taille : 250µm- 200µm **B-bis** : Autre image plus nette de la bêta-hématine protocole 2. **C** : Hématine porcine. Taille : 267µm-175µm **C-bis** : Autre image de l'hématine porcine. **D** : Hémimine. Taille : 50µm-17µm

### 3.2.2.3 Diffusion dynamique de la lumière

La dernière technique utilisée est la diffusion dynamique de lumière communément appelée DLS (Dynamic light scattering en anglais). Elle permet de mesurer la taille et distribution de taille des particules en suspension. Les solutions des quatre échantillons à 10 mg/mL étaient trop opaques pour que le faisceau lumineux puisse traverser la solution. Par conséquent, aucun rayon lumineux n'est diffusé rendant l'interprétation impossible.

L'hémine, l'hématine porcine ainsi que la bêta-hématine du protocole 1 et 2 à une concentration de 0,25 mg/mL possèdent une distribution polydispersée étant donné la valeur de l'index de polydispersité<sup>37</sup> (PDI) relativement élevé; les index de polydispersité (PDI) étant respectivement de 0,560; 0,424; 0,261 et 0,580. En effet, les composés ayant un PDI inférieur à 0,05 sont considérés comme étant des standards très fortement monodispersés alors que les composés ayant un PDI supérieur à 0,7 ont une distribution très polydispersée au point qu'ils ne pourraient pas être analysés en DLS (Dynamic Light Scattering). [89] Seule la bêta-hématine du protocole 1 et la bêta-hématine du protocole 2 ont un atténuateur<sup>38</sup> suffisamment bas que pour ne pas concentrer plus les échantillons. L'hémine 0,25mg/mL et l'hématine porcine 0,25mg/mL ont un atténuateur de 11; il faut donc concentrer ces échantillons.

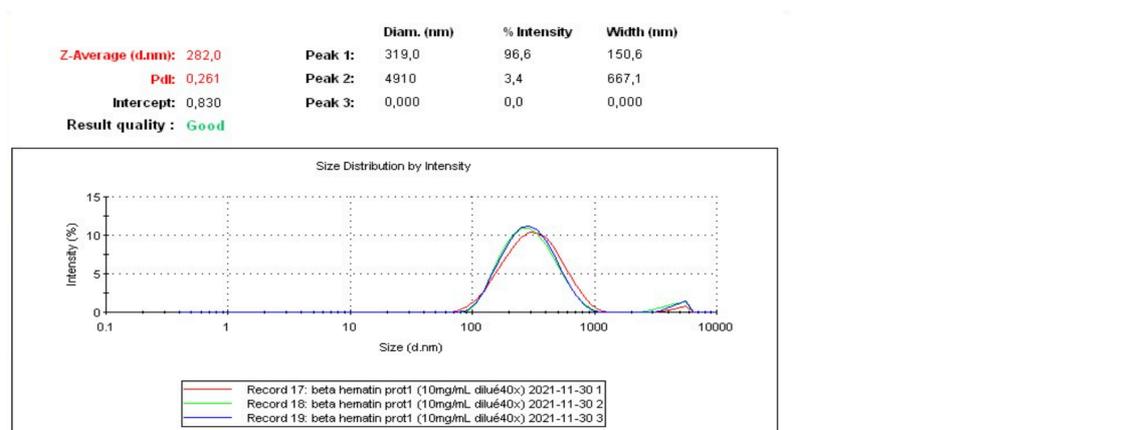
Le seul échantillon ne nécessitant pas d'optimisation est celui contenant la bêta-hématine 0,25mg/mL issue du protocole n°1. En effet, son atténuateur est faible, les courbes de

---

<sup>37</sup> Les particules d'un échantillon dit « monodispersé » auront une taille et une forme relativement sphérique et uniforme alors que les particules d'un échantillon « polydispersé » présenteront des formes asymétriques. L'intensité de la polydispersité de l'échantillon est démontrée par l'index de polydispersité (PDI). Plus celui-ci est élevé, plus l'échantillon est considéré comme polydispersé. Au contraire, plus le PDI est proche de 0, plus il est considéré comme monodispersé. Le PDI pour la DLS utilisée dans ce travail peut varier entre 0 et 1. Une valeur au-dessus de 1 signifierait que la distribution est tellement polydispersée que l'échantillon n'est pas analysable en DLS. [79]

<sup>38</sup> L'atténuateur est un paramètre qui est propre à la DLS utilisée. Il est donné en fonction du signal perçu par le détecteur de la machine. Cela signifie que plus l'atténuateur est élevé, plus la transmission du signal perçu est grande et par conséquent, plus la concentration de l'échantillon est faible. L'atténuateur est donc un indicateur pour les utilisateurs de la DLS afin de savoir si leurs échantillons sont trop peu concentrés ou au contraire trop concentrés.[79]

distribution se superposent ce qui signifie que les 3 runs enregistrés sont reproductibles. Sa qualité est considérée comme « bonne » par le logiciel (**Figure 9.**)



**Figure 9.** DLS de la bêta-hématine 0,25 mg/mL issue du protocole n°1. Taille hydrodynamique : 282,6 nm, (282,6 ± 4,160) nm. Atténuateur :4. PDI :0,261. 3 runs reproductibles.

Suite à ces résultats peu concluants de par l'absence de superposition des courbes, les atténuateurs et les PDI élevés, le protocole a été optimisé.

L'analyse de ces mêmes échantillons des quatre composés à 0,5mg/mL n'a pas révélé d'optimisation. En effet, les runs ne sont pas superposés ; les PDI ainsi que l'atténuateur augmentent.

Afin de s'assurer qu'augmenter la concentration ne permette pas une optimisation qualitative, la concentration de chaque échantillon a été augmentée une nouvelle fois à 1 mg/mL et chaque poudre d'échantillon a été micronisée dans un mortier puis au bain à ultrason pendant 15 minutes à température ambiante dans le but d'obtenir la poudre la plus homogène possible.

Les résultats obtenus n'étaient de nouveau pas qualitatifs : les spectres ne sont pas superposés, les PDI ainsi que les atténuateurs sont élevés. La taille des particules des échantillons ne peut donc pas être déterminée.

En résumé, le seul résultat pouvant nous indiquer une estimation de la taille des particules est celui de la bêta-hématine 0,25mg/mL issue du protocole n°1 (**Figure 10**). Il est cependant impossible de le comparer aux autres résultats; ces derniers étant inutilisables de par la persistance d'un atténuateur tantôt élevé et/ou de courbes non superposables.

Notons que plus la concentration des échantillons est augmentée, plus les résultats obtenus sont difficiles à interpréter. Afin de contrer ce problème, il faudrait optimiser la micronisation afin de standardiser au plus les échantillons. Ce problème a été précédemment observé lors de l'analyse en SEM: la micronisation dans un mortier ou au bain à ultrason n'a pas permis de réduire, ni d'homogénéiser la taille des « cristaux ». La taille des particules est donc impossible à évaluer dans ces conditions par DLS.

Il serait donc intéressant de procéder à de plus amples tests afin d'établir un protocole permettant une meilleure caractérisation des produits de synthèse.

### 3.2.3 Tests de solubilisation de la bêta-hématine

Deux solvants de solubilisation ont été initialement utilisés : l'hexane et l'hydroxyde de sodium. La bêta-hématine mise en présence d'hexane est insoluble, peu importe la concentration de la solution. Nous abandonnons dès lors très vite l'idée de solubiliser la bêta-hématine dans l'hexane. L'hémine et l'hématine porcine se révèlent également être insolubles dans l'hexane. La bêta-hématine est quant à elle tout à fait solubilisée dans du NaOH.

Cette solution est ensuite diluée à l'aide de méthanol ou d'eau Mili-Q. La bêta-hématine reste soluble aux différentes concentrations préparées avec l'ajout de méthanol; aucune précipitation n'a été détectée.

De même, la bêta-hématine solubilisée dans du NaOH ne précipite pas lorsqu'on la dilue dans de l'eau Mili-Q. Cependant, le pH de la solution diluée avec l'eau Mili-Q est beaucoup plus élevé que le pH de la solution diluée avec du méthanol. En effet, le pH de la solution diluée à l'eau Mili-Q est de 12 alors que celui de la solution diluée au méthanol est de 8. Il n'est donc pas intéressant d'utiliser la solution au pH trop élevé.

La solubilisation de l'hémine ainsi que de l'hématine porcine dans du méthanol et de l'eau déminéralisée a également été vérifiée aux différentes concentrations décrites dans le protocole. Aucune précipitation de ces composés n'a été observée. Ici encore, nous privilégierons la dilution dans du méthanol, au détriments de l'eau Mili-Q, car les échantillons dilués dans le méthanol présentent un pH moins élevé (pH 8) que ceux dilués dans l'eau (pH 12).

En conclusion, il est donc possible d'utiliser le méthanol ou l'eau ultra-pure comme solvant afin de diluer les solutions stock de bêta-hématine, d'hémine ou d'hématine porcine et ainsi permettre leur injection en LC-VIS. Les solutions diluées dans le méthanol sont cependant privilégiées en LC-VIS de par leur pH plus faible afin de ne pas détériorer la colonne HPLC en silice.

### 3.2.4 LC-VIS

Trois solutions stocks à 10µg/mL ont été préparées en solubilisant bêta-hématine, hémine et hématine porcine dans de l'hydroxyde de sodium 0,4M. A partir de ces solutions stock, des échantillons de concentrations différentes (2µg/mL ; 1µg/mL ; 0,5 µg/mL ; 0,25 µg/mL ; 0,2 µg/mL) ont été préparés en diluant chaque solution stock dans du méthanol ou dans de l'eau Mili-Q.

Afin d'éviter une précipitation des échantillons de bêta-hématine, d'hémine et d'hématine porcine lors de l'injection en HPLC, en présence de divers solvants, chaque échantillon a été préalablement testé en présence de chaque solvant séparément et de mélanges de solvants, constituant la phase mobile. Comme le montre la **Tableau 6.**, aucune précipitation (NP) n'a été observée et ce pour aucun des échantillons, quels que soient leurs concentrations, la solution stock utilisée (bêta-hématine, hémine, hématine porcine), le diluant de la solution stock (eau Mili-Q ou méthanol) ou encore le solvant de la phase mobile. (**Tableau 6.**) Les résultats présentés dans la **Tableau 6.** sont transposables aux solutions stock d'hémine et d'hématine porcine.

**Tableau 6.** Étude de la précipitation de différents échantillons de concentrations croissantes (solution stock de bêta-hématine diluée dans du méthanol ou de l'eau Mili-Q) dans différents solvants ou mélanges de solvants (phase mobile) à volume égal.

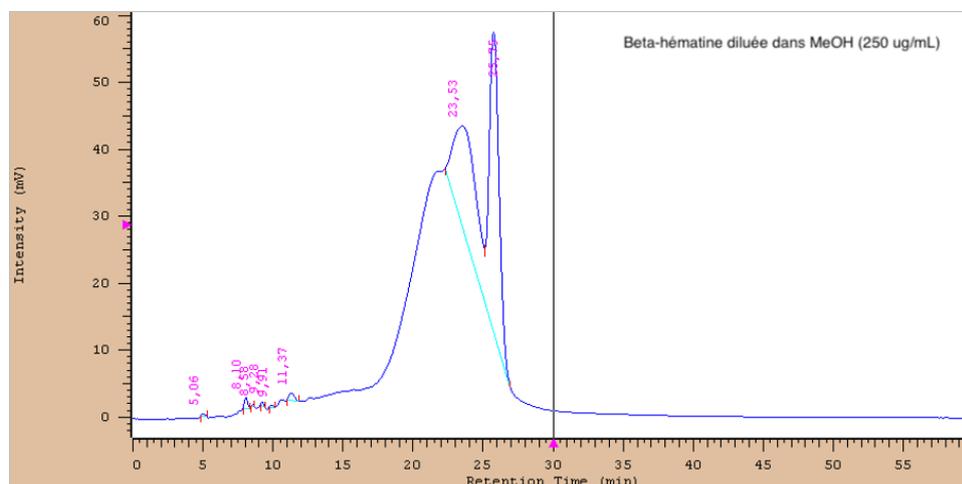
NP – Aucune précipitation.

Phase mobile (200µL) / Échantillons (200µL)	MeOH	Eau Mili-Q	Acide acétique	TFA	ACN	MeOH/Eau Mili-Q/ Ac. Acétique (32 :18 :5)	0,1% TFA (v/v) dans ACN	0,1% TFA (v/v) dans eau Mili-Q	0,05% TFA (v/v) dans ACN
1 0,2 µg/mL	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
2 0,25 µg/mL	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
3 0,5 µg/mL	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
4 1 µg/mL	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
5 2 µg/mL	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP

Les caractéristiques des échantillons ainsi que les paramètres de l'HPLC-VIS décrits dans le protocole sont mis en place afin de quantifier la bêta-hématine.

Un échantillon de bêta-hématine 2 µg/mL a été injecté en isocratique après avoir réalisé un blanc composé d'hydroxyde de sodium et de méthanol. Par contre, la solution stock de bêta-hématine diluée dans l'eau présente un pH de 12 ce qui est trop élevé pour l'injecter en HPLC-VIS. La suite des injections se fera uniquement avec une solution stock de bêta-hématine diluée dans du méthanol (pH 8).

Le chromatogramme de l'échantillon dilué dans le méthanol ne montre aucun résultat. En effet, il n'y a aucune détection; cela est probablement dû à une concentration beaucoup trop faible en bêta-hématine. Il est donc nécessaire d'augmenter la concentration de l'échantillon.



**Figure 10.** Chromatogramme en HPLC-VIS d'une solution stock de bêta-hématine diluée dans du méthanol afin d'obtenir une concentration finale de 250 µg/mL. Échantillon injecté à une longueur d'onde ( $\lambda$ ) de 395 nm selon le protocole décrit dans matériel et méthodes (cfr 3.1.4)

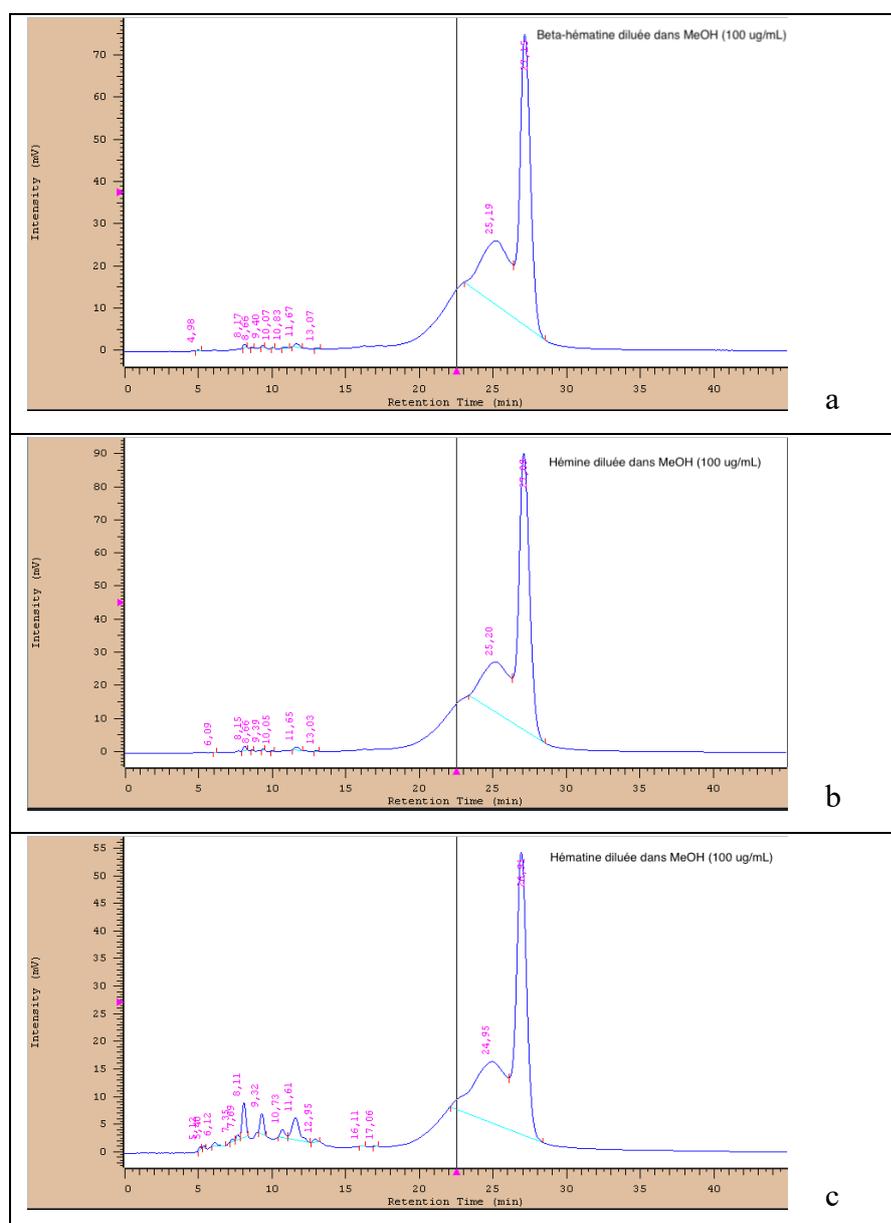
Suite à l'injection de l'échantillon de bêta-hématine à une concentration de 250 µg/mL, on obtient un chromatogramme qui contient des pics. Cela signifie qu'augmenter la concentration était nécessaire afin de permettre la détection de bêta-hématine. (**Figure 10.**)

Cependant, on peut remarquer, sur la **Figure 10**, la présence d'un triple pic. Il est donc nécessaire de s'interroger sur la présence de ce triple pic. Il pourrait être occasionné par la présence de particules de bêta-hématine de tailles différentes dans la solution, par la présence de résidus tels que de l'hémine ou de l'hématine ou encore par l'utilisation d'une phase mobile qui ne correspondrait pas à l'échantillon analysé.

Une potentielle technique imaginée pour résoudre le problème de particules de tailles différentes est la filtration des quatre échantillons de bêta-hématine (100 µg/mL ; 111,11 µg/mL ; 125 µg/mL ; 250 µg/mL). Malgré la filtration, il y a toujours présence d'un triple pic sur les chromatogrammes témoignant que ce dernier n'est pas dû à la détection de particules de bêta-hématine de tailles différentes. On en conclut donc que la filtration des échantillons n'est pas nécessaire.

La deuxième hypothèse serait que l'on détecte en même temps que la bêta-hématine, des résidus d'hémine et d'hématine puisque ceux-ci sont les précurseurs de la bêta-hématine. On observe que les pics obtenus sur les chromatogrammes des échantillons de bêta-hématine, d'hémine et d'hématine sont identiques et possèdent également un temps de rétention ( $t_r$ ) identique. On peut en conclure que les composés injectés présentent une structure semblable qui ne permet

pas de les différencier. A ce stade, il est donc impossible de conclure qu'il y ait ou non la présence d'hémine ou d'hématine. (**Figure 11**)



**Figure 11.** Chromatogramme en HPLC-VIS d'une solution stock de bêta-hématine (a), d'hémine (b) ou d'hématine (c), chacune diluée dans du méthanol afin d'obtenir une concentration finale de 100  $\mu\text{g/mL}$ . Échantillon injecté à une longueur d'onde ( $\lambda$ ) de 395 nm selon le protocole décrit dans matériel et méthodes (cfr 3.1.4). Temps de rétention entre 20 et 25 minutes.

Étant donné que la filtration et la détection d'éventuels résidus (hémine, hématine) n'ont pas contribué à l'obtention d'un simple pic, il est intéressant de changer la phase mobile et/ou de changer de mode, en passant à un mode en gradient.

Dans le but d'améliorer la résolution du triple pic, la phase mobile est changée. Les échantillons de bêta-hématine, d'hémine et d'hématine sont injectés dans ce système en mode isocratique et sont élués par la nouvelle phase mobile. Les résultats obtenus sont comparés avec ceux obtenus

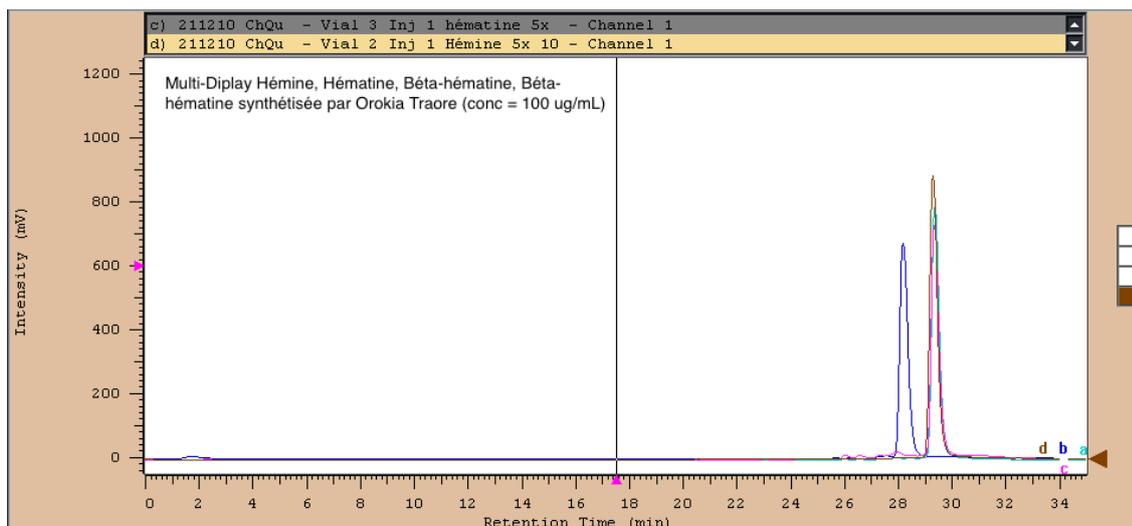
avec l'ancienne phase mobile.

En présence de la nouvelle phase mobile eau Mili-Q, méthanol, acide formique (75 : 25 : 0,1 v/v) injectée en mode isocratique, aucun résultat n'est obtenu. En effet, aucun composé n'est détecté et donc le chromatogramme ne présente aucun pic. Cette deuxième phase mobile ne permet ni l'élution ni la détection des différents composés.

Suite à ces résultats non concluants de la nouvelle phase mobile eau Mili-Q, méthanol, acide formique (75 : 25 : 0,1 v/v) injectée en isocratique, le système est nettoyé avec la première phase mobile méthanol, eau Mili-Q, acide acétique ( 256 : 144 : 40 v/v) afin d'éluer les composés qui pourraient être retenus dans la colonne. Lors de cette élution, un pic est obtenu ce qui confirme que la première phase mobile est adaptée au système et aux échantillons, contrairement à la seconde phase mobile. Cependant, la résolution n'est toujours pas optimale; le pic observé est asymétrique.

Des échantillons de bêta-hématine, d'hémine, d'hématine porcine sont ensuite injectés dans un mode en gradient. (**Tableau 2**) Le pic obtenu sur chaque chromatogramme suite à la détection des différents composés a été optimisé. En effet, le pic de chaque échantillon apparaît sur le chromatogramme comme étant un seul pic, fin et symétrique. Le mode gradient permet donc une amélioration des résultats. A ces trois échantillons, un quatrième contenant de la bêta-hématine, synthétisée préalablement par Traore O. [3], a été analysé. Dans ce dernier cas, un pic simple, fin et symétrique apparaît également sur le chromatogramme.

Afin de comparer ces chromatogrammes, un multi-display a été réalisé. On peut remarquer que la bêta-hématine synthétisée par Traore O. [3] a un temps de rétention identique à celui de l'hémine et de l'hématine porcine alors que l'autre échantillon de bêta-hématine possède un temps de rétention plus court. (**Figure 12**) Cela pourrait être expliqué par une mauvaise élution, par la présence de résidus dans l'échantillon de bêta-hématine synthétisée ou encore par les blancs utilisés entre chaque échantillon. Cette différence de temps de rétention pourrait donc être une erreur expérimentale ou un problème au niveau de l'échantillonnage.

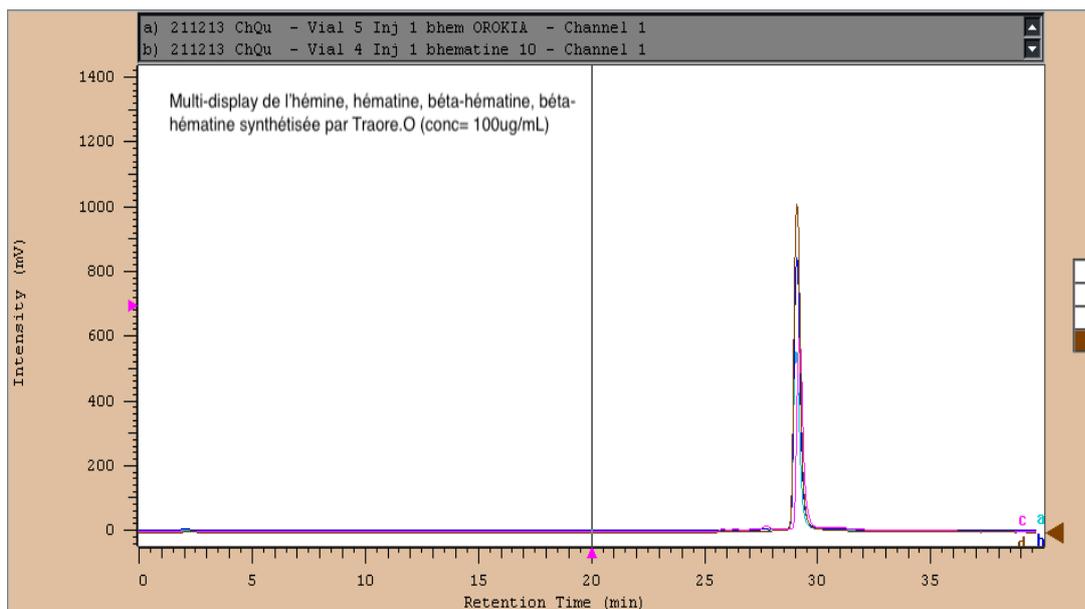


**Figure 12.** Superposition des chromatogrammes de solutions stock de bêta-hématine anciennement synthétisée par Traore O.(a), de bêta-hématine (b), d'hématine porcine (c), d'hémine (d), chacune diluée dans du méthanol afin d'obtenir une concentration finale de 100 µg/mL. Échantillons préparés et injectés à une longueur d'onde (λ) de 395 nm selon le protocole décrit dans matériel et méthodes (cfr 3.1.4). Temps de rétention : 28 minutes pour la bêta-hématine (b), 29 minutes pour la bêta-hématine anciennement synthétisée.(a), 29 minutes pour l'hématine porcine (c) et 29 minutes pour l'hémine (d).

Les pics obtenus sur les chromatogrammes sortent à la fin de l'analyse. (**Figure 12**) Afin de les déplacer vers le milieu du chromatogramme, un allongement du temps d'analyse et/ou une modification du gradient doivent être envisagés.

De nouveaux échantillons de bêta-hématine, de bêta-hématine synthétisée par Traore O.[3], d'hémine, d'hématine porcine sont préparés dans le but d'être analysés dans un mode gradient différent du précédent où le temps de l'analyse a été allongé. (**Tableau 3.**) L'injection de ces échantillons permettra d'identifier le problème obtenu suite aux temps de rétention différents. (**Figure 12**)

Une superposition des chromatogrammes a également été réalisée de façon à comparer les quatre échantillons analysés. Les deux bêta-hématine ont un temps de rétention identique qui équivaut à 29 minutes. (**Figure 13**)

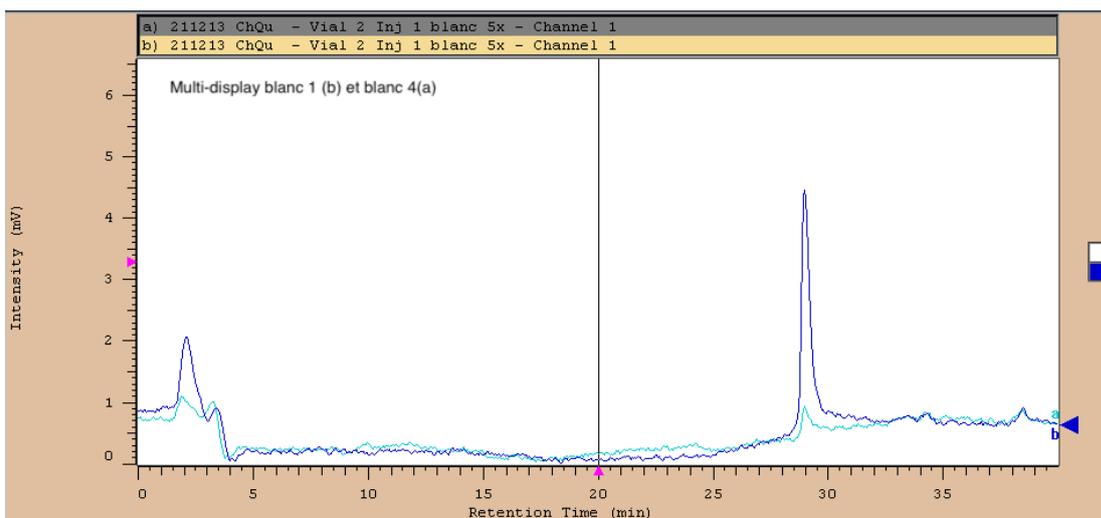


**Figure 13.** Superposition des chromatogrammes de solutions stock de *bêta-hématine anciennement synthétisée par Traore O.*(a), de *bêta-hématine* (b), d'*hématine porcine* (c), d'*hémine* (d), chacune diluée dans du méthanol afin d'obtenir une concentration finale de 100 µg/mL. Échantillons préparés et injectés à une longueur d'onde ( $\lambda$ ) de 395 nm selon le protocole décrit dans matériel et méthodes (cfr 3.1.4). Temps de rétention : 29 minutes pour la *bêta-hématine* (b), 29 minutes pour la *bêta-hématine anciennement synthétisée* (a), 29 minutes pour l'*hématine porcine* (c) et 29 minutes pour l'*hémine* (d)

La dernière étape consiste à éviter le carry-over qui correspond à un pic d'analyte présent sur le chromatogramme d'un blanc injecté après l'échantillon. Ce pic est présent sur le chromatogramme du blanc mais également sur celui de l'échantillon au même temps de rétention ( $T_R$ ); cependant, l'aire du carry-over est inférieure à l'aire du pic de l'analyte présent dans l'échantillon injecté. Il est donc nécessaire de réduire le carry-over afin d'éviter que les analytes issus des analyses précédentes ne demeurent présents dans le système LC. Ceci mènera à un surdosage lors de la quantification, l'accumulation. Jusqu'à présent, tous les échantillons étaient séparés par un blanc. Il est donc nécessaire, dans le but d'établir une droite de calibration, de connaître le nombre de blancs qui doivent séparer les échantillons de sorte qu'il n'y ait pas d'accumulation de substances dans la colonne ce qui pourrait fausser les résultats.

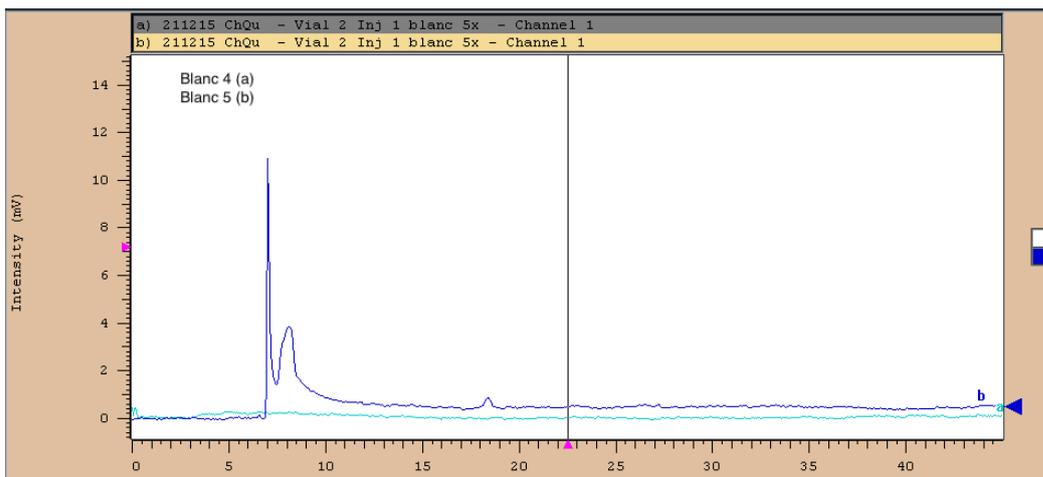
Le gradient utilisé est toujours le même que pour les échantillons précédents ainsi que le temps de run qui est de 40 minutes. (**Tableau 3.**)

Avant l'injection des blancs, un échantillon de bêta-hématine à 100 µg/mL est injecté. Quatre blancs seront nécessaires pour diminuer le carry-over et ainsi empêcher la récolte de résultats faussés. (**Figure 14**)



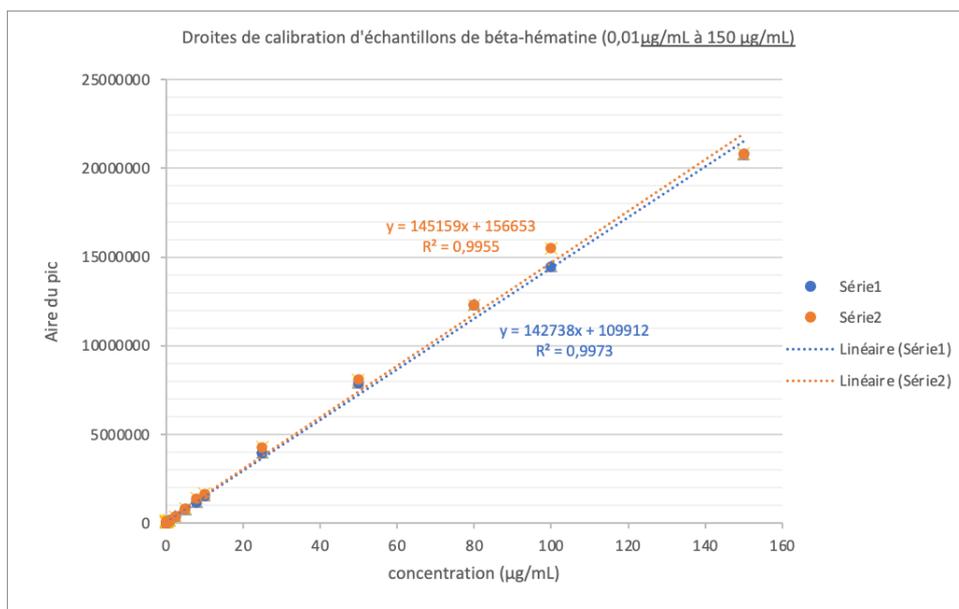
**Figure 14 :** Superposition des chromatogrammes du blanc numéro un (b) qui est le blanc injecté après l'injection de bêta-hématine 100µg/mL et du blanc numéro quatre (a) qui est le dernier blanc à être injecté. Le carry-over a fortement diminué au quatrième blanc.

Un dernier essai d'optimisation des carry-over a été réalisé. Après injection de bêta-hématine à 100µg/mL à un gradient tel que représenté au **Tableau 3.**, quatre blancs ont été injectés en isocratique via un mélange de méthanol, d'eau Mili-Q et d'acide acétique (256 : 144 : 40 v/v). Aucun pic n'apparaît sur le chromatogramme des quatre blancs. Il n'y a donc pas de carry-over présent lors de l'injection de 4 blancs consécutifs à l'injection d'un échantillon. Cependant, un cinquième blanc injecté, cette fois, en gradient (**Tableau 3.**) permet de détecter un pic de haute intensité sur le chromatogramme. En effet, un carry-over est apparu alors que lors de l'injection des 4 blancs en isocratique, aucun carry-over n'est détecté. Cela signifie que les blancs doivent également être injectés en gradient afin de permettre une élution complète des résidus présents dans la colonne. (**Figure 15**) Cette méthode n'est cependant pas idéale pour gérer le problème de carry-over étant donné que le temps d'analyse de chaque blanc est très long.



**Figure 15** : Superposition des chromatogrammes du blanc numéro quatre (a) qui est le dernier blanc injecté en mode isocratique et du blanc numéro cinq (b) qui est le blanc injecté en mode gradient. Un pic au cinquième blanc réapparaît.

Enfin, de façon à vérifier que tous les paramètres de l'HPLC permettent un dosage significatif de la bêta-hématine, deux droites de calibration ont été réalisées. **(Figure 16)** Le protocole ainsi développé et décrit a été testé en injectant en HPLC-VIS des échantillons de bêta-hématine de concentrations échelonnées de 0,01 µg /mL à 150 µg /mL, selon un gradient et des phases mobiles à présent connus. De 0,01 µg/mL à 10 µg/mL, chaque échantillon est séparé du précédent par deux blancs. Les échantillons à une concentration de 10 µg/mL jusque 150 µg/mL sont injectés après l'injection de 4 blancs. Chaque concentration d'échantillon a été testée en duplicata.



**Figure 16 :** Droites de calibration d'échantillons de la bêta-hématine de 0,01 µg/mL, à 150 µg/mL. Chaque échantillon est préparé à partir d'une solution stock de bêta-hématine et est diluée dans du méthanol afin d'obtenir les concentrations désirées. De 0,01 µg/mL à 10 µg/mL, chaque échantillon est séparé du précédent par deux blancs. Les échantillons à une concentration de 10 µg/mL jusque 150 µg/mL sont injectés après l'injection de 4 blancs. Les blancs sont composés d'hydroxyde de sodium 0,4M et de méthanol. La phase stationnaire utilisée est une colonne de silice greffée C18. Le mode utilisé est un gradient.

L'analyse de ces deux droites de régression révèle un coefficient de détermination ( $R^2$ ) de 0,9955 et de 0,9973. Celles-ci sont respectivement caractérisées par la relation  $y = 145159x + 156653$  et par  $y = 142738x + 109912$ .

Le coefficient de détermination ( $R^2$ ) équivalent à 1 signifie que l'équation de la droite de régression est capable de déterminer 100% de la distribution des points. Dans le cas présent,  $R^2$  étant très élevé et proche de 1, signifie que l'ensemble des points sont alignés ou quasiment alignés sur cette droite de régression.

A l'aide de ces deux équations, il serait donc possible de déterminer la concentration en bêta-hématine d'une solution à partir de la mesure de l'absorbance de cette solution.

Une méthode de quantification de la bêta-hématine en LC-VIS est donc possible.

#### 4 Conclusions et perspectives

L'émergence de résistances aux traitements anti-malariques pousse les chercheurs à étudier de nouvelles molécules présentant potentiellement une activité anti-malarique. [64] Dans ce contexte, certains composés issus de venins de crapauds sont à l'étude à l'UMons, dans le Laboratoire d'Analyse Pharmaceutique. [25,62,63] Afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques, les chercheurs étudient différentes caractéristiques de l'hémozoïne telles que sa structure et sa formation. Alors que sa synthèse par polymérisation est le moyen de défense mis en place par le parasite face à la toxicité de l'hème, l'hémozoïne pourrait aussi être le « talon d'Achille » du parasite; certaines drogues anti-malariques interférant avec sa synthèse. [90] L'hémozoïne a un analogue synthétique qui est la bêta-hématine. Une évaluation quantitative *in vitro* de la formation bêta-hématine, en présence de composés aux propriétés antipaludiques potentielles, permettrait d'étudier la capacité de ces composés à inhiber la voie de synthèse conduisant à la formation de bêta-hématine.

Ce travail de recherche se donnait pour objectif de jeter les premières bases du développement d'une méthode de quantification de la bêta-hématine en LC-VIS.

En première partie, deux protocoles de synthèse de bêta-hématine (protocole 1 et 2), à partir d'hémine, ont été développés en se basant sur des méthodes de synthèse existantes et ont été optimisés, en modifiant les concentrations de départ et les temps d'incubation. Pour chacun des deux protocoles, le milieu réactionnel utilisé possède un pH acide proche de celui de la vacuole digestive du parasite soit un milieu réactionnel qui, *in vivo*, permet la biosynthèse de l'hémozoïne.

Ces deux protocoles optimisés ont permis d'obtenir un rendement moyen de synthèse de  $(44 \pm 2)\%$  pour l'un et de  $(60 \pm 4)\%$  pour l'autre et ont permis de comparer les deux produits obtenus. Ces échantillons de synthèse ont été étudiés par FT-IR, SEM et DLS afin de s'assurer que les produits synthétisés dans les deux protocoles correspondaient bien à de la bêta-hématine. Ils ont également été comparés aux précurseurs de la bêta-hématine: l'hémine et l'hématine.

Couramment utilisée dans le cadre de la caractérisation de protoporphyrines, la FT-IR a révélé lors de l'analyse des produits synthétisés via les protocoles 1 et 2, la présence de trois bandes spectrales caractéristiques de la bêta-hématine. Ces bandes spectrales sont différentes de celles observées pour l'hémine et l'hématine. Ces résultats suggèrent que les produits obtenus à l'issue des deux protocoles de synthèse sembleraient être de la bêta-hématine.

L'observation par SEM a révélé que les produits synthétisés au laboratoire présentaient une morphologie et une taille différentes de celles des cristaux de bêta-hématine ou d'hémozoïne

habituellement décrites dans la littérature. Les structures observées pour nos deux protocoles de synthèse de bêta-hématine, après micronisation, présentent un aspect irrégulier, non cristallin et plutôt amorphe avec présence de nombreuses petites irrégularités de surface. Ces structures pourraient être des agrégats amorphes de bêta-hématine, revêtant à leur surface de petits cristaux ou des petits dépôts amorphes. Il est toutefois impossible, sur base de l'analyse en SEM de déduire que ces structures sont bien des cristaux de bêta-hématine ou des agrégats de bêta-hématine. Un protocole de synthèse de bêta-hématine dans un milieu qui mime l'environnement lipidique et à pH acide tel qu'on peut le rencontrer dans la vacuole digestive des parasites [85] ou un protocole de synthèse tel que décrit par Jaramillo et al. [53] devraient être des voies privilégiées pour la poursuite de ce travail. Ils devraient permettre la synthèse de cristaux plus similaires à ceux extraits des parasites, ce qui permettra dès lors leur utilisation comme modèle. Toutefois, la bêta-hématine synthétisée dans nos deux protocoles, bien qu'elle ne revête pas les caractéristiques de cristallinité observées pour l'hémozoïne ou dans certains protocoles de synthèse, nous permet d'obtenir, en des temps de synthèse courts, les rendements nécessaires à la réalisation de nos multiples échantillonnages et tests de solubilisation. Elle devrait également nous permettre de tester *in vitro*, lors d'un prochain développement, l'efficacité de composés et molécules anti-malariques sur la synthèse de bêta-hématine.

Dans la présente situation, l'analyse par diffusion dynamique de DLS n'a pas permis d'obtenir des résultats probants. Cette méthode de mesure de la taille des particules en suspension n'a pu permettre l'identification et la caractérisation des produits synthétisés dans nos deux protocoles et ne permet également pas une comparaison avec l'hémimine, l'hématine. L'augmentation des concentrations des échantillons analysés n'a pas permis de déterminer la taille des particules des échantillons analysés. La micronisation dans un mortier ou au bain à ultrason n'a pas permis de réduire, ni d'homogénéiser la taille des « cristaux ». Optimiser les paramètres d'analyse ainsi que la micronisation afin de standardiser au mieux les échantillons, seront des voies à suivre afin de faciliter l'obtention de résultats quant à la distribution de la taille des particules.

Parmi ces trois techniques d'identification et de caractérisation, seule la FT-IR semble nous confirmer dans le cas présent que la molécule synthétisée dans les deux protocoles, serait bien de la bêta-hématine.

La deuxième partie concerne la séparation chromatographique. Avant de pouvoir injecter les échantillons en HPLC-VIS et de permettre une éventuelle quantification de la bêta-hématine, des tests de solubilisation de la bêta-hématine de synthèse ont été effectués. Une fois solubilisée dans du NaOH, la solution de bêta-hématine a été diluée dans du méthanol ou de l'eau ultra-

pure. Le méthanol, fut privilégié par la suite vu son pH plus faible (~ pH 8) en vue d'assurer une meilleure compatibilité avec le système LC.

Il était également essentiel de déterminer une composition de phase mobile qui évite toute précipitation des échantillons de bêta-hématine. Aucun des mélanges de solvants testés, constituant la phase mobile, n'a engendré de précipitation des échantillons de bêta-hématine de synthèse.

Lors de la séparation chromatographique, le passage du mode isocratique au mode gradient et l'allongement du temps d'analyse, ont permis de générer les chromatogrammes.

La méthode de séparation ainsi développée a permis de construire une droite de calibration pour une gamme de concentrations entre 0,01 µg /mL à 150 µg /mL.

Un phénomène de carry-over important a également été constaté. Différentes approches ont été tentées afin d'y remédier. Seul un rinçage conséquent en mode gradient s'est montré satisfaisant.

Ces différents points contribuent à conclure qu'il est possible de quantifier la bêta-hématine en LC-VIS. Cependant de nombreux axes d'amélioration sont encore présents.

- Développer une stratégie plus simple afin d'éliminer le phénomène de carry-over
- Tenter d'améliorer la sensibilité afin de rejoindre un domaine de concentrations plus proche des concentrations cibles présentes dans les tests *in vitro*
- Réaliser une validation analytique

Pour rappel, disposer d'une méthode de quantification de la bêta-hématine en LC-VIS apportera un moyen supplémentaire d'évaluation de test *in vitro* de l'efficacité de molécules candidates anti-malariques ayant pour mode d'action cible la synthèse de l'hémozoïne.

L'avantage résiderait dans le fait qu'un tel test ne requiert pas la présence du parasite. En effet, les molécules à tester seraient évalués lors d'un test de polymérisation de l'hémimine en bêta-hématine en présence d'un agent inducteur. La quantité de l'analogue de l'hémozoïne formée et quantifiée en LC-VIS, sera le témoin de l'action de la molécule sur cette synthèse et au delà, confirmerait le mode d'action de l'agent anti-malarique testé.

## 5 Bibliographie

1. Fact Sheet about Malaria. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria>. Consulté le 30 avril 2022.
2. World Health Organization. World Malaria Report 2021. World Health Organization, 2021. WHO IRIS, <https://apps.who.int/iris/handle/10665/350147>.
3. Traore, Orokia. « Diagnostic de la malaria: développement d'une méthode innovante de quantification du pigment malarique et étude des représentations sociales de la maladie et de son diagnostic au Burkina Faso. » Service d'Analyse Pharmaceutique & Service de Chimie Thérapeutique et Pharmacognosie. Faculté de Médecine et de Pharmacie. Université de Mons. 2020
4. Prevention, CDC-Centers for Disease Control and. CDC - Malaria - About Malaria - Biology. 16 juillet 2020, <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>.
5. Milner, Danny A. « Malaria Pathogenesis ». Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, vol. 8, n° 1, janvier 2018, p. a025569. PubMed Central, <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025569>.
6. Yombi, J.C et Olinga, U.N. « La malaria : aspect clinique et thérapeutique ». Louvain Med 2015; 134 (9): 499-509.
7. Antinori, Spinello, et al. « Non-Human Primate and Human Malaria: Past, Present and Future ». Journal of Travel Medicine, vol. 28, n° 5, juillet 2021, p. taab036. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1093/jtm/taab036>.
8. Lee, Andrew H., et al. « DNA Repair Mechanisms and Their Biological Roles in the Malaria Parasite Plasmodium Falciparum ». Microbiology and Molecular Biology Reviews, vol. 78, n° 3, septembre 2014, p. 469-86. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1128/MMBR.00059-13>.
9. Sato, Shigeharu. « Plasmodium—a brief introduction to the parasites causing human malaria and their basic biology ». Journal of Physiological Anthropology, vol. 40, janvier 2021, p. 1. PubMed Central, <https://doi.org/10.1186/s40101-020-00251-9>.
10. Radtke, Andrea J., et al. « Lymph-Node Resident CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> Dendritic Cells Capture Antigens from Migratory Malaria Sporozoites and Induce CD8<sup>+</sup> T Cell Responses ». PLOS Pathogens, édité par Jean Langhorne, vol. 11, n° 2, février 2015, p. e1004637. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004637>.

11. Beyer, Konrad, et al. « Limited Plasmodium Sporozoite Gliding Motility in the Absence of TRAP Family Adhesins ». *Malaria Journal*, vol. 20, n° 1, décembre 2021, p. 430. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1186/s12936-021-03960-3>.
12. Frischknecht, Friedrich, et Kai Matuschewski. « Plasmodium Sporozoite Biology ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, vol. 7, n° 5, mai 2017, p. a025478. PubMed, <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025478>.
13. Topçu, Selma. « Infection des hépatocytes par Plasmodium : rôle des protéines de micronèmes des sporozoïtes. » Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 10 mars 2016. [tel.archives-ouvertes.fr](https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01728727), <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01728727>.
14. Srinivasan, Prakash, et al. « Binding of *Plasmodium* Merozoite Proteins RON2 and AMA1 Triggers Commitment to Invasion ». *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 108, n° 32, août 2011, p. 13275-80. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1073/pnas.1110303108>.
15. *Microneme - MeSH - NCBI*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/2101084>. Consulté le 4 août 2022.
16. Castro, Marcia C. « Malaria Transmission and Prospects for Malaria Eradication: The Role of the Environment ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, vol. 7, n°10, octobre 2017, p. a025601. PubMed, <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025601>.
17. Rossati, Antonella, et al. « Climate, Environment and Transmission of Malaria ». *Le Infezioni in Medicina*, vol. 24, n° 2, juin 2016, p. 93-104.
18. Ferreira, Ana, et al. « Sickle Hemoglobin Confers Tolerance to Plasmodium Infection ». *Cell*, vol. 145, n° 3, avril 2011, p. 398-409. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.049>.
19. Prevention, CDC-Centers for Disease Control and. *CDC - Malaria - Malaria Worldwide - How Can Malaria Cases and Deaths Be Reduced?* 28 janvier 2019, [https://www.cdc.gov/malaria/malaria\\_worldwide/reduction/index.html](https://www.cdc.gov/malaria/malaria_worldwide/reduction/index.html).
20. « Comment la drépanocytose protège du paludisme ». *Le Quotidien du Médecin*, <https://www.lequotidiendumedecin.fr/archives/comment-la-drepanocytose-protege-du-paludisme>. Consulté le 30 avril 2022.
21. Langhi, Dante M., et José Orlando Bordin. « Duffy Blood Group and Malaria ». *Hematology (Amsterdam, Netherlands)*, vol. 11, n° 5, octobre 2006, p. 389-98. PubMed, <https://doi.org/10.1080/10245330500469841>.
22. Prevention, CDC-Centers for Disease Control and. *CDC - Malaria - About Malaria - Biology*. 16 juillet 2020, <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>.

23. Luzzatto, Lucio. “ Sickle Cell Anaemia and Malaria”. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, vol. 4, n° 1, octobre 2012, p. e2012065. PubMed Central, <https://doi.org/10.4084/MJHID.2012.065>.
24. Phillips, Margaret A., et al. « Malaria ». *Nature Reviews. Disease Primers*, vol. 3, août 2017, p. 17050. PubMed, <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.50>.
25. Quintart, Charlotte. « Evaluation of Hemolytic activity of compounds isolated from toad venom » Service d'Analyse Pharmaceutique. Faculté de Médecine et de Pharmacie. Université de Mons.2020
26. Dunst, Josefine, et al. « Cytokines and Chemokines in Cerebral Malaria Pathogenesis ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 7, juillet 2017, p. 324. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00324>.
27. Cours de Bioanalyse sur les TDR -Prof Blankert et Prof Hambye. Faculté de Médecine et de Pharmacie. Université de Mons.
28. Pluess, Bianca, et al. « Indoor Residual Spraying for Preventing Malaria ». *Cochrane Database of Systematic Reviews*, édité par Cochrane Infectious Diseases Group, avril 2010. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006657.pub2>.
29. Munywoki, Daniel N., et al. « Insecticide Resistance Status in Anopheles Gambiae (s.l.) in Coastal Kenya ». *Parasites & Vectors*, vol. 14, n° 1, décembre 2021, p. 207. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04706-5>.
30. Minetti, Corrado, et al. « Effects of Insecticide Resistance and Exposure on Plasmodium Development in Anopheles Mosquitoes ». *Current Opinion in Insect Science*, vol. 39, juin 2020, p. 42-49. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1016/j.cois.2019.12.001>.
31. Antonio-Nkondjio, Christophe, et al. « Review of the Evolution of Insecticide Resistance in Main Malaria Vectors in Cameroon from 1990 to 2017 ». *Parasites & Vectors*, vol. 10, n° 1, décembre 2017, p. 472. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2417-9>.
32. Gentile, James E., et al. « Modelling Sterile Insect Technique to Control the Population of Anopheles Gambiae ». *Malaria Journal*, vol. 14, n° 1, décembre 2015, p. 92. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0587-5>.
33. « La prévention du paludisme selon les pays ». VIDAL, <https://www.vidal.fr/sante/voyage/avant-voyage/prevention-paludisme/divers-pays.html>. Consulté le 1 mai 2022.
34. Zavala, Fidel. « RTS,S: The First Malaria Vaccine ». *Journal of Clinical Investigation*, vol. 132, n° 1, janvier 2022, p. e156588. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1172/JCI156588>.

35. White, N. J. « The Treatment of Malaria ». *New England Journal of Medicine*, vol. 335, n° 11, septembre 1996, p. 800-06. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1056/NEJM199609123351107>.
36. White, N. J. « Assessment of the Pharmacodynamic Properties of Antimalarial Drugs in Vivo ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 41, n° 7, juillet 1997, p. 1413-22. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1128/AAC.41.7.1413>.
37. Dung, Nguyen Phuong, et al. « Treatment of Malaria in Vietnam with Oral Artemisinin ». *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 48, n° 3, mars 1993, p. 398-402. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1993.48.398>.
38. Nguyen, D S et al. "Treatment of malaria in Vietnam with oral artemisinin." *The American journal of tropical medicine and hygiene* vol. 48,3 (1993): 398-402.
39. Ashley, Elizabeth A., et al. « Malaria ». *The Lancet*, vol. 391, n° 10130, avril 2018, p. 1608-21. DOI.org (Crossref), [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30324-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30324-6).
40. Garavito, Giovanni. « Etude pharmacologique expérimentale de l'activité antipaludique d'un composé de synthèse: le chlorure de methylthionium ». Université Paul Sabatier - Toulouse III, 29 juin 2007. [tel.archives-ouvertes.fr](http://tel.archives-ouvertes.fr), <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00639025>.
41. Ludlow, John T., et al. « Methemoglobinemia ». StatPearls, StatPearls Publishing, 2022. PubMed, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537317/>.
42. Diou, Juliette « Influence des pigments malariques sur l'infection et la dissémination du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) » Département de biologie moléculaire et cellulaire. Faculté de Médecine. Université Laval. Québec. 2009.
43. Tekwani, Babu L, and Larry A Walker. "Targeting the hemozoin synthesis pathway for new antimalarial drug discovery: technologies for in vitro beta-hematin formation assay." *Combinatorial chemistry & high throughput screening* vol. 8,1 (2005): 63-79. doi:10.2174/1386207053328101
44. Egan, Timothy J. "Recent advances in understanding the mechanism of hemozoin (malaria pigment) formation." *Journal of inorganic biochemistry* vol. 102,5-6 (2008): 1288-99. doi:10.1016/j.jinorgbio.2007.12.004
45. Kumar, Sanjay, et Uday Bandyopadhyay. « Free Heme Toxicity and Its Detoxification Systems in Human ». *Toxicology Letters*, vol. 157, n° 3, juillet 2005, p. 175-88. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.03.004>.
46. Pek, Rini H., et al. « Hemozoin Produced by Mammals Confers Heme Tolerance ». *ELife*, vol. 8, octobre 2019, p. e49503. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.7554/eLife.49503>.

47. Demirev, Plamen A. « Mass Spectrometry for Malaria Diagnosis ». *Expert Review of Molecular Diagnostics*, vol. 4, n° 6, novembre 2004, p. 821-29. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1586/14737159.4.6.821>.
48. Salganik, R I et al. “Chloroquine resistance of Plasmodium berghei: biochemical basis and countermeasures.” *Bulletin of the World Health Organization* vol. 65,3 (1987): 381-6.
49. Pisciotta, John M., et al. « Quantitative Characterization of Hemozoin in Plasmodium Berghei and Vivax ». *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, vol. 7, no 1, avril 2017, p. 110-19. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2017.02.001>.
50. Traore, Orokia, et al. « Development and Validation of an Original Magneto-Chromatography Device for the Whole Blood Determination of Hemozoin, the Paramagnetic Malaria Pigment ». *Microchemical Journal*, vol. 157, septembre 2020, p. 105043. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105043>.
51. Solomonov, Inna, et al. « Crystal Nucleation, Growth, and Morphology of the Synthetic Malaria Pigment  $\beta$ -Hematin and the Effect Thereon by Quinoline Additives: The Malaria Pigment as a Target of Various Antimalarial Drugs ». *Journal of the American Chemical Society*, vol. 129, n° 9, mars 2007, p. 2615-27. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1021/ja0674183>.
52. Chen, Andy J., et al. « Quantitative imaging of intraerythrocytic hemozoin by transient absorption microscopy ». *Journal of Biomedical Optics*, vol. 25, n° 01, décembre 2019, p. 1. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1117/1.JBO.25.1.014507>.
53. Jaramillo, Maritza, et al. « Synthetic Plasmodium-Like Hemozoin Activates the Immune Response: A Morphology - Function Study ». *PLoS ONE*, édité par Gordon Langsley, vol. 4, n° 9, septembre 2009, p. e6957. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006957>.
54. Carvalho, P. A., et al. « Differences between Synthetic  $\beta$ -Haematin and Native Hemozoin Crystals ». *Microscopy and Microanalysis*, vol. 19, n° S4, août 2013, p. 49-50. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1017/S143192761300086X>.
55. Slater, A. F., et al. « An Iron-Carboxylate Bond Links the Heme Units of Malaria Pigment. » *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 88, n° 2, janvier 1991, p. 325-29. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1073/pnas.88.2.325>.
56. Bohle, D.S., et al. “Structural and spectroscopic studies of  $\beta$ -hematin (the heme coordination polymer in malaria pigment)”. *Inorg. Organomet. Polym. II*, Washington DC, 1994: pp. 497–515.

57. Kapishnikov, Sergey, et al. « Mode of Action of Quinoline Antimalarial Drugs in Red Blood Cells Infected by *Plasmodium Falciparum* Revealed in Vivo ». *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 116, n° 46, novembre 2019, p. 22946-52. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1073/pnas.1910123116>.
58. Muangphrom, Paskorn, et al. « Artemisinin-Based Antimalarial Research: Application of Biotechnology to the Production of Artemisinin, Its Mode of Action, and the Mechanism of Resistance of Plasmodium Parasites ». *Journal of Natural Medicines*, vol. 70, n° 3, juillet 2016, p. 318-34. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1007/s11418-016-1008-y>.
59. Fitch, C. D., et al. « Involvement of Lipids in Ferriprotoporphyrin IX Polymerization in Malaria ». *Biochimica Et Biophysica Acta*, vol. 1454, n° 1, mai 1999, p. 31-37. PubMed, [https://doi.org/10.1016/s0925-4439\(99\)00017-4](https://doi.org/10.1016/s0925-4439(99)00017-4).
60. Tripathi, Abhai K., et al. « In Vitro  $\beta$ -Hematin Formation Assays with Plasma of Mice Infected with Plasmodium Yoelii and Other Parasite Preparations ». *Life Sciences*, vol. 69, n° 23, octobre 2001, p. 2725-33. DOI.org (Crossref), [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(01\)01349-2](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(01)01349-2).
61. Afshar, Fariba H., et al. « Evaluation of Antimalarial, Free-Radical-Scavenging and Insecticidal Activities of Artemisia Scoparia and A. Spicigera, Asteraceae ». *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 21, n° 6, décembre 2011, p. 986-90. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000144>.
62. Wells, Mathilde, et al. "Identifying new potential antimalarial compound in toad venoms through a bio-guided fractionation process" in "1st Congress of the European Venom Network EUVEN"
63. Wells, Mathilde, et al. "Développement d'une stratégie de fractionnement bio-guidé pour l'identification de composés antiplasmodiaux issus de venins de Bufonidae." in "14ème Congrès Francophone sur les Sciences Séparatives et les Couplages de l'AFSEP" , Paris, France (2021)
64. Clarke, B. T. « The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications ». *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, vol. 72, n° 3, août 1997, p. 365-79. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1017/S0006323197005045>.
65. Cui, Xiaoyan, et al. « Anti-Hepatitis B Virus Activities of Cinobufacini and Its Active Components Bufalin and Cinobufagin in HepG2.2.15 Cells ». *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 33, n° 10, 2010, p. 1728-32. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1248/bpb.33.1728>.

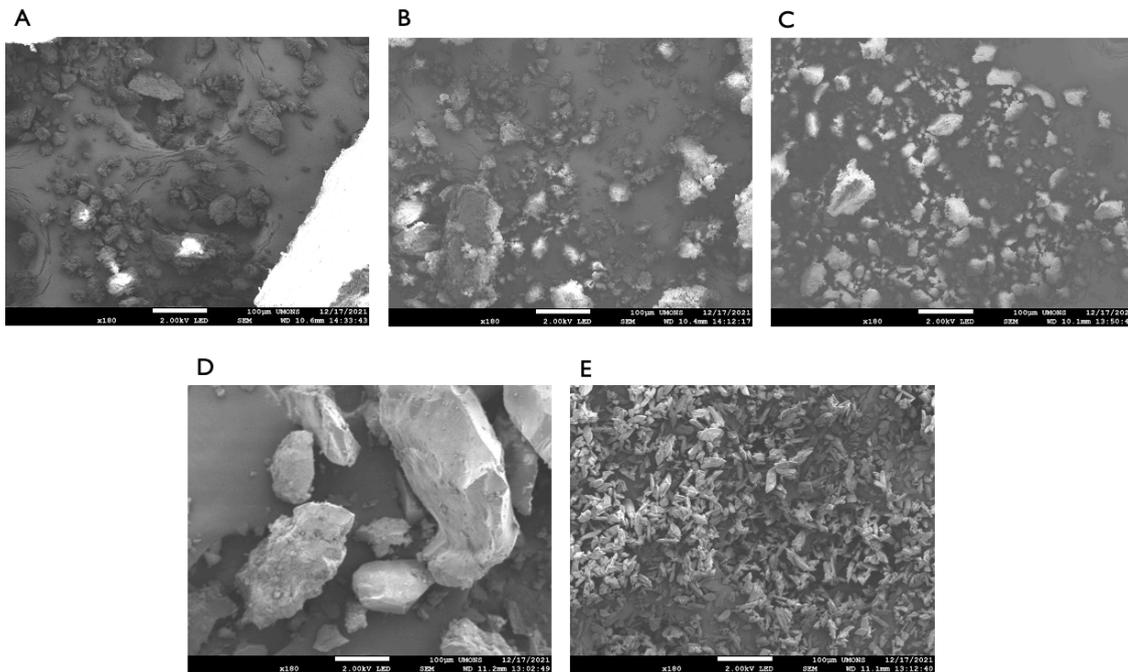
66. Liu, Congyan et al. "Comparison of toad skins *Bufo bufo gargarizans* Cantor from different regions for their active constituents content and cytotoxic activity on lung carcinoma cell lines." *Pharmacognosy magazine* vol. 10,39 (2014): 207-12. doi:10.4103/0973-1296.137358
67. Ferreira, Paulo Michel Pinheiro et al. "Antiproliferative activity of *Rhinella marina* and *Rhaebo guttatus* venom extracts from Southern Amazon." *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* vol. 72 (2013): 43-51. doi:10.1016/j.toxicon.2013.06.009
68. Puschett, Jules B et al. "Emerging role of the bufadienolides in cardiovascular and kidney diseases." *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* vol. 56,2 (2010): 359-70. doi:10.1053/j.ajkd.2010.01.023
69. Lenaerts, Charline et al. "Revealing of endogenous Marinobufagin by an ultra-specific and sensitive UHPLC-MS/MS assay in pregnant women." *Talanta* vol. 187 (2018): 193-199. doi:10.1016/j.talanta.2018.05.020
70. Rush, Margaret A., et al. « Colorimetric High-Throughput Screen for Detection of Heme Crystallization Inhibitors ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 53, no 6, juin 2009, p. 2564-68. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1128/AAC.01466-08>.
71. Egan, Timothy J., et al. « The Mechanism of  $\beta$ -Hematin Formation in Acetate Solution. Parallels between Hemozoin Formation and Biomineralization Processes ». *Biochemistry*, vol. 40, n° 1, janvier 2001, p. 204-13. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1021/bi0013501>.
72. Herraiz, Tomás, et al. « Antimalarial Quinoline Drugs Inhibit  $\beta$ -Hematin and Increase Free Hemin Catalyzing Peroxidative Reactions and Inhibition of Cysteine Proteases ». *Scientific Reports*, vol. 9, n° 1, octobre 2019, p. 15398. *PubMed*, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51604-z>.
73. Sandlin, Rebecca D., et al. « Detergent-Mediated Formation of  $\beta$ -Hematin: Heme Crystallization Promoted by Detergents Implicates Nanostructure Formation for Use as a Biological Mimic ». *Crystal Growth & Design*, vol. 16, n° 5, mai 2016, p. 2542-51. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.5b01580>.
74. Protocole FT-IR établi par Sarah Gariffo
75. Akhtar, Kalsoom, et al. « Scanning Electron Microscopy: Principle and Applications in Nanomaterials Characterization ». *Handbook of Materials Characterization*, édité par

- Surender Kumar Sharma, Springer International Publishing, 2018, p. 113-45. *DOI.org (Crossref)*, [https://doi.org/10.1007/978-3-319-92955-2\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-92955-2_4).
76. « Métalliseur pour échantillon MEB ». *Scientec*, <https://www.scientec.fr/produit/metalliseur-pour-echantillon-meb/>. Consulté le 31 juillet 2022.
77. *JEOL SEM Cylinder Specimen Stubs for Electron Microscopes*. - Rave Scientific. <https://ravescientific.com/sem-sample-stubs/jeol-sem-stubs>. Consulté le 31 juillet 2022.
78. Protocole SEM De Nathan Puozzo
79. Falke, Sven, and Christian Betzel. “Dynamic Light Scattering (DLS): Principles, Perspectives, Applications to Biological Samples.” *Radiation in Bioanalysis: Spectroscopic Techniques and Theoretical Methods* vol. 8 173–193. 29 Jul. 2019, doi:10.1007/978-3-030-28247-9\_6
80. Park, YongKeun et al. “Refractive index maps and membrane dynamics of human red blood cells parasitized by Plasmodium falciparum.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 105,37 (2008): 13730-5. doi:10.1073/pnas.0806100105
81. Hong, Yu-Long, et al. « The Interaction of Artemisinin with Malarial Hemozoin ». *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 63, n° 1, janvier 1994, p. 121-28. *DOI.org (Crossref)*, [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(94\)90014-0](https://doi.org/10.1016/0166-6851(94)90014-0).
82. Fyrestam, Jonas, et Conny Östman. « Determination of Heme in Microorganisms Using HPLC-MS/MS and Cobalt(III) Protoporphyrin IX Inhibition of Heme Acquisition in Escherichia Coli ». *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 409, n° 30, décembre 2017, p. 6999-7010. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0610-5>.
83. Blauer, G., et M. Akkawi. « Investigations of B- and  $\beta$ -Hematin ». *Journal of Inorganic Biochemistry*, vol. 66, n° 2, mai 1997, p. 145-52. *DOI.org (Crossref)*, [https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(96\)00200-0](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(96)00200-0).
84. Nesrine, Oueslati. « Identification des intermédiaires de la réduction du dioxygène par la cytochrome c oxydase et ses modèles en faisant appel à la spectroscopie IR différentielle. » Autre. Université de Strasbourg, 2012. Français. NNT : 2012STRAF027ff.
85. Ketchum, Megan A., et al. « Hematin crystallization from aqueous and organic solvents ». *The Journal of Chemical Physics*, vol. 139, n° 12, septembre 2013, p. 121911. *aip.scitation.org (Atypon)*, <https://doi.org/10.1063/1.4816106>.

86. Chen, Andy J et al. "Quantitative imaging of intraerythrocytic hemozoin by transient absorption microscopy." *Journal of biomedical optics* vol. 25,1 (2019): 1-11. doi:10.1117/1.JBO.25.1.014507
87. Carvalho, P. A., et al. « Differences between Synthetic  $\beta$ -Haematin and Native Hemozoin Crystals ». *Microscopy and Microanalysis*, vol. 19, n° S4, août 2013, p. 49-50. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1017/S143192761300086X>.
88. Bohle, D. Scott, et al. « Phase homogeneity and crystal morphology of the malaria pigment  $\beta$ -hematin ». *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, vol. 58, n° 10, octobre 2002, p. 1752-56. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1107/S0907444902014294>.
89. Danaei, M., et al. « Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems ». *Pharmaceutics*, vol. 10, n° 2, mai 2018, p. 57. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>.
90. Kapishnikov, Sergey, et al. « Malaria Pigment Crystals: The Achilles' Heel of the Malaria Parasite ». *ChemMedChem*, vol. 16, n° 10, mai 2021, p. 1515-32. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1002/cmdc.202000895>.

## ANNEXE

**Annexe 1.** Images à haute résolution des porphyrines. **A** : Bêta-hématine protocole 1 métallisée. **B** : Bêta-hématine protocole 2 métallisée. **C** : Bêta-hématine synthétisée par Traore.O métallisée. **D** : Hématine porcine métallisée. **E** : Hémine métallisée.



Grille n°1 : Production écrite – Lecteurs					Note attribuée						
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	...../20
Critères	Inacceptable	Insuffisant	Satisfaisant	Très bien	Commentaires						
<b>Qualité formelle</b> Table des matières <input type="checkbox"/> Structure <input type="checkbox"/> Orthographe/syntaxe <input type="checkbox"/>	Non-respect de plus de deux critères	Non-respect de deux critères	Non-respect d'un critère	Respect de tous les critères							
<b>Bibliographie</b> Quantité <input type="checkbox"/> Qualité <input type="checkbox"/> Référencement <input type="checkbox"/>	Quantité insuffisante Sources non fiables Trop d'erreurs de référencement	Deux critères moyennement respectés	Un critère moyennement respecté	Les trois critères sont respectés							
<b>Qualité contenu</b> 1. Introduction <input type="checkbox"/> 2. Objectif(s) du travail <input type="checkbox"/> 3. Corps du sujet ou Partie expérimentale <input type="checkbox"/> 4. Conclusion <input type="checkbox"/> 5. Bibliographie <input type="checkbox"/> Résumé <input type="checkbox"/>	Majorité des parties mauvaises / Manque crucial de contenu	Deux à trois parties sont de moins bonne qualité / en dessous du niveau	Une à deux partie(s) de moins bonne qualité / une partie est en dessous du niveau	Toutes les parties sont de bonne qualité							
<b>Rigueur scientifique</b>	Erreur importante	Rigueur scientifique fort imprécise	Détails à améliorer au niveau de la rigueur scientifique	Rigueur scientifique respectée							
<b>Point bonus</b>	Pas d'originalité particulière			Originalité à souligner							

Grille n°2 : Défense orale – Membres du jury											Note attribuée
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	...../20
Critères	Inacceptable	Insuffisant	Satisfaisant	Très bien	Commentaires						
<b>Support</b> Lisibilité Illustrations Orthographe	Plus de deux critères ne sont pas respectés	Deux critères ne sont pas respectés	Un des critères n'est pas respecté	Tous les critères sont respectés							
<b>Qualité oratoire</b> fluidité, captive le jury	Difficulté de compréhension du discours / Lit son texte	Problème de voix mais discours relativement compréhensible/ Lit son texte	Discours fluide mais manque d'assurance	Discours fluide et captivant (bonnes constructions des phrases)							
<b>Qualité du contenu</b> liens entre l'écrit et l'oral MAIS sans redite/copier-coller du document écrit	Redite de l'écrit / pas de valeur ajoutée / Erreurs importantes dans la présentation	Liens insuffisants / erreurs importantes à légères dans la présentation	Liens intéressants erreurs légères dans la présentation	Liens intéressants et pertinents pour la présentation / Valeur ajoutée suite à l'écrit / Pas ou très peu d'erreurs dans la présentation							
<b>Rigueur scientifique</b>	La rigueur scientifique n'est pas suffisamment présente	La rigueur scientifique n'est que partielle	La rigueur scientifique est majoritairement présente	La rigueur scientifique est impeccable							
<b>Réponses aux questions du jury / des professionnels</b>	Réponses erronées ou erreur importante	Réponses majoritairement à compléter ou nuancer	Réponses majoritairement intéressantes	Réponses intéressantes et pertinentes							
<b>Point bonus</b>	Pas d'originalité particulière			Originalité à souligner							

Grille n°3 : Séance de questions réponses – Membres du jury					Note attribuée						
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	...../20
Critères	Inacceptable		Insuffisant		Satisfaisant		Très bien			Commentaires	
<b>Réponses aux questions du jury / des professionnels</b>	Réponses erronées ou erreur importante		Réponses majoritairement à compléter ou nuancer		Réponses majoritairement intéressantes		Réponses intéressantes et pertinentes				
<b>Point bonus</b>	Pas d'originalité particulière				Originalité à souligner						

Résultat final	
Y a-t-il une information importante que le promoteur souhaiterait partager avec le jury avant d'attribuer la note ?	
<b>/20</b>	Commentaires / décisions prises :