

L'ARTEMISINE EN TISANE

**Un projet de production locale pour le traitement du paludisme
dans les pays les plus pauvres**

M ONIMUS¹, J-M VOUILLOT², G CLERC³



**Artémisia Contre Paludisme
Amis Comtois des Missions Centrafricaines**

Février 2012

¹ Professeur honoraire de chirurgie orthopédique infantile, Université de Franche Comté. F-25000 Besançon. www.acmc-ong.net

² Ingénieur agricole ISARA Lyon. Artemisia Contre Paludisme 7 Grande Rue F-25330 Longeville. www.acp-paludisme.org

³ Artemisia Contre Paludisme 7 Grande Rue F-25330 Longeville. www.acp-paludisme.org

LA TISANE D' *ARTEMISIA ANNUA*

Ce qu'il faut savoir en pratique (petit résumé des pages suivantes)...

1) La Culture de *l'Artemisia Annuua*

Semis: les graines d'*Artemisia annua* sont très petites (plus de 10 000 graines par gramme) et il est conseillé de les mélanger avec du sable fin ou de la cendre (une cuillerée de graines pour 5 à 6 cuillerées de sable ou de cendre) avant de semer. Il faut semer dans une boîte remplie de terre meuble et bien arrosée.

Un repiquage est nécessaire ; on le réalise lorsque le semis devient trop dense, habituellement 3 à 4 semaines après le semis, ou lorsque les plants atteignent 4 cm de haut, en repiquant chaque plant dans de petits pots (type pots de yaourt).

Puis quand les plants ont atteint une hauteur de 15 cm, ou que 5 à 6 feuilles ont poussé, on peut repiquer en pleine terre, habituellement après 3 nouvelles semaines. Après avoir préparé la terre, on repique tout le contenu du pot, en espaçant suffisamment les plants. Il faut arroser et désherber au début ; par la suite aucun traitement particulier n'est nécessaire.

La croissance ultérieure demande plusieurs semaines. Sous des climats tempérés, comme c'est le cas en France, la plante peut atteindre une hauteur de 1,5 à 2 mètres et il faut repiquer en ménageant des intervalles de 80 cm entre les plants, pour avoir un espacement suffisant. Lorsque la durée du jour est invariable, comme c'est le cas en Afrique noire, la maturation est rapide et la croissance des plants ne dépasse pas 20 à 80 cm de hauteur.

En Afrique, il semble que la culture de *l'Artemisia annua* soit plus difficile, et plusieurs expériences se sont soldées par des échecs. Contrairement à ce que l'on pensait, il semble préférable de ne pas semer directement en pleine terre et donc de semer dans une boîte de terre bien ameublie et surtout d'arroser abondamment. Les semences sont photosensibles et la germination est meilleure si les graines restent proches de la surface. Par ailleurs si la plante adulte est répulsive pour les insectes, les jeunes pousses peuvent être ravagées par les chenilles (cutworm ou ver gris) et P Lutgen (comm part) conseille de les protéger par un traitement avec des solutions à 1% d'huile ou d'extrait de neem, ou même de traiter le sol avec une telle solution avant semences. Idéalement il faut préparer la terre avec du compost et de la terre de termitière, puis légèrement tasser la terre avec un rouleau ou une planche, puis semer. Il faut garder la graine en atmosphère humide et arroser généreusement surtout si l'on plante en saison sèche. Pour conserver l'humidité, qui est essentielle pour la germination, on peut recouvrir la zone semée avec une fine couche de terre meuble ou de sable ou un film de plastique. Lors du repiquage, l'espace entre les plants peut n'être que de 30 à 60 cm étant donné la petite taille des plants à maturation.

2) La récolte des feuilles

Classiquement il faut la faire dès le bourgeonnement des fleurs, au début de la floraison, car la concentration en artémisine est maximum au moment du bourgeonnement et décroît rapidement après la floraison. En fait des travaux récents ont montré que la teneur en

artémisine n'est pas un élément essentiel, et on peut faire la récolte jusqu'en fin de floraison. La récolte se fait habituellement 4 à 5 mois après la plantation.

Le procédé de récolte le plus simple consiste à couper et rassembler les plants, puis les étaler sur un tissu pour le séchage. Le séchage est indispensable car la concentration en artémisine est nettement plus importante dans les feuilles sèches que dans les feuilles vertes ; il peut se faire à l'ombre ou au soleil, le séchage à l'ombre étant préférable pour la teneur en artémisine. Lorsque la plante est sèche (après environ 4 à 5 jours) il faut détacher les feuilles des tiges les plus volumineuses. Les feuilles contiennent surtout l'artémisine, mais elles ne sont pas seules à contenir les principes actifs ; les tiges contiennent notamment les flavonoïdes et il est préférable de garder les petites tiges sur lesquelles s'attachent les feuilles. Ceci peut se faire en frappant les plants contre une surface dure, ou en empaumant les plants à leur base et en arrachant les feuilles en remontant la main de bas en haut le long de la tige. On peut aussi ne pas couper la tige, la laisser sur pied et arracher chaque tigelle une par une, puis faire sécher. Ce procédé est nettement plus long, mais les feuilles gardent leur aspect normal et surtout la teneur en artémisine est maximum. Enfin après séchage il faut stocker les feuilles dans des sacs en tissu opaque dans un endroit frais et à l'ombre et éviter soigneusement de ré humidifier les feuilles.

Il peut être difficile de déterminer précisément la phase de transition entre les feuilles et la floraison, car les feuilles ont tendance à disparaître au moment du bourgeonnement ; de plus les fleurs sont de très petite taille, avec une coloration jaunâtre, et il est souvent délicat de les différencier de petites feuilles.

3) La récolte des graines

Elle ne doit être faite ni trop tôt car elles risquent de ne pas être arrivées à maturité, ni trop tard car elles risquent de tomber par terre et d'être perdues. Le procédé le plus simple consiste à couper les tiges et les secouer contre un plan dur ou les battre pour faire tomber les graines. Quand les graines sont en formation, on peut enfermer les terminaisons florales (sans les serrer) dans un petit sac en plastique percé de trous, afin d'éviter la dissémination des graines et de limiter les impuretés.

A noter que si l'on récolte les feuilles juste avant la floraison, on risque de compromettre la récolte de graines. Lorsque l'on commence une plantation d'*Artemisia annua*, il faut donc ne pas récolter toutes les feuilles et conserver une partie des plants pour récolter ultérieurement les graines, en les repérant avec un tissu ou une marque quelconque.

4) La préparation de la tisane

La quantité de feuilles recommandée pour la préparation en tisane est de 5 à 7 grammes de feuilles pour un litre d'eau bouillante (soit une bonne cuiller à soupe). Il faut utiliser un récipient en plastique ou mieux en verre pour faire infuser, et éviter un récipient en fer (le fer réagissant avec l'artémisine). Il faut verser l'eau bouillante sur les feuilles (ne pas poursuivre l'ébullition avec les feuilles, car cela détruit l'artémisine), remuer le mélange avec une cuiller en bois, puis laisser infuser 10 minutes, le récipient étant recouvert. Puis il faut filtrer la tisane (par exemple dans un tissu pour éviter le contact avec une passoire en fer), presser les feuilles pour récupérer les reliquats d'artémisine dissoute, et enfin laisser refroidir la tisane.

A noter que l'on peut également utiliser de *l'Artemisia annua* fraîche, avec des résultats aussi bons. Il faut alors faire macérer une poignée de feuilles dans de l'eau, puis essorer et boire le jus, ou encore piler une poignée de plante, presser la pâte obtenue, et boire.

5) La posologie de la tisane

Chez l'adulte, la posologie recommandée est de 1 litre par jour en 4 prises de 250 cc. Chez l'enfant, la posologie est de 15 à 20 cc/kg, c'est-à-dire ½ litre en 4 prises pour un poids de 30 kg (4 fois un pot de yaourt bien rempli), ou 120 à 130 ml en 4 prises pour un poids de 7 kg (4 fois un quart de pot de yaourt).

Lorsque l'administration par voie orale est impossible, (en cas de neuropaludisme avec coma...), l'administration par voie rectale est possible sous forme de goutte-à-goutte à l'aide d'une canule rectale, avec la même posologie que par voie orale, c'est-à-dire pour l'adulte un litre de tisane dans laquelle ont infusé 9 à 10 grammes de feuilles d'*Artemisia annua*, à répéter les jours suivants.

6) Ce que l'on peut retenir en 2012...

On peut retenir les quelques points suivants :

- L'artémisine est présente surtout dans les feuilles, mais les flavonoïdes sont présents surtout dans les tiges de *l'Artemisia annua* ; il est donc préférable d'utiliser toute la plante pour faire la tisane.
- *L'Artemisia annua* fraîche est aussi efficace que les feuilles séchées ; on peut donc l'utiliser sous les deux formes, éventuellement même en pilant la plante fraîche, ce qui peut simplifier la préparation.
- La teneur en artémisine n'étant pas l'élément principal, il n'est pas nécessaire de récolter les feuilles exactement au début de la floraison, mais pendant ou même juste après celle-ci.
- L'adjonction de sucre, parfois proposée pour neutraliser l'amertume de la tisane, est à déconseiller, car le sucre favoriserait le développement du parasite.
- *L'Artemisia annua* a un rôle curatif, mais aussi un rôle préventif (une prise hebdomadaire serait suffisante...).

AVANT PROPOS

L'utilisation de la tisane d'*Artémisia annua* dans le traitement du paludisme est un sujet « brûlant » ; elle déchaîne les passions et elle est source d'interminables controverses, parfois sans grande objectivité. D'innombrables travaux ont été consacrés à ce sujet... Le but de ce travail est de présenter de la façon la plus complète possible cette méthode de traitement, sous tous ses aspects, depuis la culture de la plante jusqu'à l'analyse de l'efficacité de la tisane. Nous sommes favorables au développement du traitement du paludisme par la tisane d'*Artémisia annua*, qui apporte non seulement l'artémisine (nous préférons dire artémisine, terme plus français que « artémisinine », dérivant du mot anglais artemisinin), mais aussi de nombreuses autres molécules qui ont une action synergique et qui potentialisent l'artémisine; cependant nous avons essayé de ne pas passer sous silence les inconvénients ou les limites de la méthode. Tel qu'il est, ce texte comporte très probablement des lacunes ou des inexactitudes ; nous serons heureux de les corriger... Nous souhaitons que ce livret permette à ceux qui le souhaitent de tenter l'expérience de la culture de *l'Artémisia annua*.

INTRODUCTION

Le paludisme reste un problème de santé mondial, responsable de la mort de plusieurs millions de personnes chaque année, dont une très forte proportion d'enfants. Il est actuellement officiellement admis que le traitement à base d'artémisine combinée à des molécules à action plus lente (ACT : artemisinin combined therapy) est le moyen le plus efficace pour lutter contre le paludisme dû au *Plasmodium falciparum* (71,73). C'est le traitement recommandé par l'OMS (57). L'artémisine supprime la parasitémie plus rapidement que tout autre antipaludéen ; elle agit précocement dans le cycle parasitaire par son effet parasitocide (3). Cependant les traitements actuels à base d'artémisine ou de ses dérivés semi-synthétiques (arthemeter, artésunate, arteether) restent coûteux (près de 10 fois plus chers que les traitements classiques) et donc le plus souvent non accessibles à la plupart des familles dans les pays les plus pauvres. Par ailleurs ces traitements ne sont pas toujours disponibles dans les régions endémiques les plus reculées. Dans une étude faite à Bangui (République Centrafricaine) portant sur la disponibilité des antipaludéens et leur utilisation, Manirakiza (46) constate que les traitements par artémisine ou dérivés n'étaient disponibles que dans 35 sur 82 établissements évalués, et le médicament le plus couramment prescrit et utilisé était la Chloroquine (66,7%), l'arthemeter ne représentant que 2,4%. Selon le Rapport mondial sur le paludisme de l'OMS (74), en 2008 38% des enfants fébriles étaient mis sous traitement antipaludique en Afrique noire, et seulement 3% avaient accès aux ACT. De plus la durée de vie de l'artémisine et surtout de ses dérivés est brève (29), ne dépassant pas quelques semaines, notamment en cas de conservation à température ambiante de plus de 35°. Enfin, les présentations disponibles sur les marchés sont parfois des imitations d'origine douteuse, à teneur en artémisine insuffisante ou contenant d'autres substances totalement inactives ou toxiques. Newton (54) a rassemblé 391 échantillons de médicaments douteux vendus sous le nom d'artésunate dans le Sud-Est asiatique. La moitié d'entre eux (49,9 %) ne contenait pas d'artésunate ou en trop faible quantité. Par contre différentes molécules étaient présentes, dont certaines à potentiel cancérigène. Dans une étude semblable portant sur des médicaments vendus sous le nom d'artésunate, Sengaloundeth (63) a constaté que dans 22 cas sur 25 les comprimés étaient des médicaments contrefaits sans aucune trace d'artésunate. La multiplication des antipaludéens contrefaits devient ainsi un problème de santé publique. Pourtant, en raison de sa grande efficacité immédiate, l'artémisine devrait être une solution pour résoudre la tragédie que représente le paludisme chez l'enfant dans les régions endémiques.

La préparation des feuilles d'*Artemisia annua* (ou *Quinghao*) sous forme de tisane est utilisée dans la médecine traditionnelle chinoise depuis des siècles ; elle a été redécouverte par les Chinois lors de la guerre du Vietnam. L'artémisine en a été extraite en 1975 et elle a été proposée pour le traitement de toutes les formes de paludisme chez l'homme, et notamment le paludisme dû au *plasmodium falciparum* multi-résistant. Au vu de la littérature récente, il apparait cependant que le potentiel antipaludéen de l'*Artemisia annua* n'est pas uniquement dû à l'artémisine, et plusieurs travaux ont montré que de nombreuses autres molécules

contenues dans la plante, essentiellement des flavonoïdes, ont également une action antipaludéenne propre ou synergique de l'artémisine, et il semble que l'importance donnée à l'artémisine ait été surestimée. Le rôle des flavonoïdes présents dans les feuilles et les tiges d'*Artemisia annua* valorise ainsi beaucoup l'utilisation de la tisane pour traiter l'accès palustre (22, 26, 58). Une alternative à l'utilisation de la tisane actuellement en cours d'évaluation est de préparer les feuilles d'*Artemisia annua* sous forme de gélules, plus simples à administrer que la tisane, apportant toutes les molécules présentes dans les feuilles, utilisables par voie rectale chez l'enfant, mais plus coûteuses.

L'*Artemisia annua* est facile à cultiver, et de ce fait elle peut être disponible sur place. La tisane peut être consommée pour un coût pratiquement nul. Cependant l'artémisine a pour inconvénient sa rapidité d'élimination, et donc la brièveté de son action. Cela expose à un risque de récurrence précoce de l'accès palustre, et cela impose de poursuivre le traitement par tisane durant plusieurs jours. Malgré ces imperfections, il est tentant de proposer de traiter l'accès palustre par l'administration de tisane à base de feuilles d'*Artemisia annua*, quasi gratuite et quasi universellement cultivable sur place, comme une alternative aux traitements médicamenteux modernes, coûteux et parfois non disponibles (78). A partir d'une revue de la littérature portant sur la culture de l'*Artemisia annua* et portant sur l'efficacité de l'artémisine et des flavonoïdes présents dans la tisane, et à partir de l'analyse de quelques cas personnels traités par tisane d'*Artemisia annua*, les auteurs évaluent ce moyen de traitement de l'accès palustre, comme une alternative dans les cas où les traitements officiels ne sont pas disponibles localement. Ils ont développé un programme de culture d'*Artemisia annua* dont les buts sont de fournir localement des semences aux populations vivant dans les régions sous-développées à endémie paludéenne, de favoriser la culture et la production locale de l'*Artemisia annua*, de promouvoir la connaissance de la plante et de fournir documents et conseils. Pour ce faire, ils ont créé une association non gouvernementale « Artemisia Contre Paludisme (ACP) » dont le siège est situé à Longeville (Franche Comté, France). La plante est cultivée en pleine terre à une altitude de 700 m, sans fertilisants.

L'HISTOIRE DE L'ARTEMISIA ANNUA

C'est à la suite des ravages faits par le paludisme dans les rangs de l'armée nord-vietnamienne que Mao Tsé Toung a mis en route en 1967, en pleine révolution culturelle, le projet « 523 » (ainsi nommé parce qu'il a été lancé le 23 Mai 1967), qui était un programme secret de recherche sur le traitement du paludisme, basé sur l'étude des traitements de la médecine traditionnelle chinoise (41). L'Académie de Médecine Traditionnelle Chinoise a confié cette recherche à l'un de ses membres, Youyou TU, jeune pharmacienne âgée de 36 ans, dont le nom est resté totalement ignoré jusque dans les années récentes (44).

Mme Youyou TU, membre de l'Académie de Médecine Traditionnelle Chinoise, à qui a été confié en 1967 la recherche d'un médicament efficace sur le paludisme, et qui a isolé la molécule d'artémisine.



Il faut dire que, durant la révolution culturelle, l'individu passait au deuxième plan derrière le groupe, et qu'il pouvait être dangereux de se faire trop remarquer. Il est intéressant de noter que les premières publications consacrées à l'artémisine (81) ne comportaient pas de nom d'auteur... Ce n'est qu'en 2005 que le nom de Youyou TU a été associé à la découverte de l'artémisine, et qu'elle est devenue célèbre : « "Je participais à une réunion à Shangai en 2005 avec tous les spécialistes chinois du paludisme, et j'ai demandé qui avait découvert l'artémisine," raconte Louis Miller, un chercheur sur le paludisme au US National Institutes of Health de Rockville, Maryland. "J'ai été surpris de découvrir que personne ne le savait." En 2011, Youyou TU a reçu le prestigieux prix Lasker DeBakey Clinical Research (53).

Youyou TU a rassemblé plusieurs milliers de recettes à base d'herbe ; elle a évalué 380 extraits de différentes plantes, parmi lesquelles l'*Artemisia annua* (ou *Qinghao*), qui était connue depuis très longtemps pour son efficacité pour traiter la fièvre récurrente. Ainsi, au 4^{ème} siècle, GE HONG en donnait une recette de préparation très précise : « prendre une branche d'*Artemisia annua* ; faire tremper dans 400 ml d'eau ; presser vigoureusement, recueillir le jus et boire ». Ou encore « piler soigneusement une branche d'*Artemisia annua* dans un mortier, puis presser pour recueillir le jus, et boire ». A noter qu'il s'agit dans ces préparations de plante fraîche, et non pas de feuilles séchées... A noter également qu'il s'agit de toute la plante et non pas seulement des feuilles... (80).

Plus tard, au 11^{ème} siècle, SHEN GUA recommandait l'utilisation d'*Artemisia apiacea* (couleur bleu vert en période de floraison) plutôt que *Artemisia annua* (coloration vert clair), en raison d'une efficacité plus importante (30). Or l'*Artemisia apiacea* contient beaucoup de flavonoïdes, mais peu d'artémisine (39)...

Au 11^{ème} siècle, SHEN GUA recommandait l'Artemisia apiacea plutôt que l'Artemisia annua en raison d'une meilleure efficacité. Or l'Artemisia apiacea contient beaucoup de flavonoïdes, mais peu d'artémisine (Qinghaosu)...



Les premiers résultats obtenus par Youyou TU ont été décevants, car les extraits étaient préparés avec de l'eau bouillante qui détruisait les composants actifs. C'est en 1971, en réalisant une extraction par de l'éther à basse température, qu'elle a obtenu des extraits qu'elle a testés en laboratoire sur des souris et des singes infectés par le parasite avec une efficacité pratiquement de 100% (83). Après avoir vérifié sur elle-même l'innocuité de l'extrait, elle a testé l'extrait sur l'homme, sur 21 patients impaludés, guéris à 90%. En 1972 elle a isolé une substance considérée comme l'élément actif de l'*Artemisia annua*, et lui a donné le nom d'artémisine (ou Qinghaosu, le suffixe *su* signifiant « la substance active »). Mais on peut encore noter que les premiers essais positifs avaient été faits avec de l'*Artemisia annua* produite dans la région de Pékin, contenant peu d'artémisine. Comme Youyou TU désirait disposer de beaucoup d'artémisine, elle a ensuite utilisé de l'*Artemisia annua* provenant de la région du Sichuan, très riche en artémisine, avec les mêmes résultats cliniques, ce qui suggère encore que la concentration optimale en artémisine n'est pas nécessairement la concentration maximale...

En 1975 Youyou TU a déterminé la structure de la molécule d'artémisine (sesquiterpène lactone). En 1979 la publication d'un article dans le Chinese Medical Journal (81) fait connaître l'artémisine ; en 1981, le 4^{ème} congrès du Groupe de Travail Scientifique sur la Chimiothérapie du Paludisme, sponsorisé par le PNUD, la Banque Mondiale et l'OMS se tient à Pékin. L'artémisine devient connue dans le monde entier, et elle soulève l'intérêt des grandes firmes pharmaceutiques, qui produisent les dérivés semi-synthétiques que l'on connaît (artésunate hydrosoluble, arthémeter liposoluble...), aboutissant en 1986 à la mise sur le marché des premiers médicaments à base d'artémisine. Devant l'efficacité du produit, en 2004 l'OMS en commence la promotion à grande échelle, et recommande son utilisation en association avec d'autres molécules « classiques » (les ACT, ou Artemisinin Combined Therapy). Enfin, en 2011, l'OMS recommande l'utilisation de l'artésunate en monothérapie par voie intra veineuse au lieu de sels de quinine dans le traitement du paludisme grave de l'enfant.

LA CULTURE DE L'ARTEMISIA ANNUA

Semis: les graines d'*Artemisia annua* sont très petites (plus de 10 000 graines par gramme) et il est conseillé de les mélanger avec du sable fin ou de la cendre (une cuillerée de graines pour 5 à 6 cuillerées de sable ou de cendre) avant de semer. Il faut semer dans une boîte remplie de terre meuble et bien arrosée. Pour conserver l'humidité, on peut recouvrir le semis avec un plastique transparent. Un repiquage est nécessaire ; on le réalise lorsque le semis devient trop dense, habituellement 3 à 4 semaines après le semis, ou lorsque les plants atteignent 4 cm de haut, en repiquant chaque plant dans de petits pots (type pots de yaourt). Puis quand les plants ont atteint une hauteur de 15 cm, ou que 5 à 6 feuilles ont poussé (fig 1 et 2), on peut repiquer en pleine terre.



Fig 1. La plante a grandi dans un pot ; 5 feuilles ont poussé ; elle peut être repiquée en pleine terre.

Ceci se fait habituellement après 3 nouvelles semaines. Après avoir préparé la terre, on repique tout le contenu du pot, en espaçant suffisamment les plants.



Fig 2. Aspect 6 jours après le semis.



Aspect 2 semaines après le semis.

Fig 2. Dans cette plantation, les plants ont poussé dans de petits sacs. Ils sont prêts à être repiqués en pleine terre.



Il faut arroser et désherber au début ; par la suite aucun traitement particulier n'est nécessaire. La croissance ultérieure demande plusieurs semaines. Dans l'expérience des auteurs à Longeville, avec un semis au printemps au début du mois d'Avril, le repiquage est réalisé durant la dernière semaine d'Avril et la récolte des feuilles se fait à la fin du mois d'Août. Sous des climats tempérés, comme c'est le cas en France, la plante peut atteindre une hauteur de 1,5 à 2 mètres et il faut repiquer en ménageant des intervalles de 80 cm entre les plants, pour avoir un espacement suffisant, permettant une bonne croissance et un bon développement des feuilles sur toute la hauteur de la tige. Cinq grammes de graines sont suffisants pour ensemercer un hectare en pleine terre.

Lorsque la durée du jour est invariable, comme c'est le cas en Afrique noire, la maturation est rapide et la croissance des plants ne dépasse pas 50 à 80 cm de hauteur, et il faut faire la récolte des feuilles dès que la plante arrive à maturation. En Afrique, il semble que la culture de *l'Artemisia annua* soit plus difficile, et plusieurs expériences se sont soldées par des échecs. Contrairement à ce que l'on pensait, il semble préférable de ne pas semer directement en pleine terre et donc de semer dans une boîte de terre bien ameublie et surtout d'arroser abondamment. Les semences sont photosensibles et la germination est meilleure si les graines restent proches de la surface. Par ailleurs si la plante adulte est répulsive pour les insectes, les jeunes pousses peuvent être ravagées par les chenilles (cutworm ou ver gris) et P Lutgen (com part) conseille de les protéger par un traitement avec des solutions à 1% d'huile ou d'extrait de neem, ou même de traiter le sol avec telle solution avant semences. Idéalement il faut préparer la terre avec du compost et de la terre de termitière, puis légèrement tasser la terre avec un rouleau ou une planche, puis semer. Il faut garder la graine en atmosphère humide et arroser généreusement surtout si l'on plante en saison sèche. Pour conserver l'humidité, qui est essentielle pour la germination, on peut recouvrir la zone semée avec une fine couche de terre meuble ou de sable, ou encore recouvrir le semis d'un fin plastique transparent. Lors du repiquage, l'espace entre les plants peut n'être que de 30 à 60 cm étant donné la petite taille des plants à maturation.

Différents essais ont été effectués par l'association Artemisia Contre Paludisme : dans une culture faite au Sénégal, le bourgeonnement a commencé 3 mois après le semis et la plante a atteint une hauteur de 60 cm. Dans une autre culture au Bénin, le semis a été fait en Janvier et le repiquage 3 semaines après ; la hauteur maximum obtenue était de 1 mètre. Dans un essai de culture au Burkina Faso la plante n'a grandi que jusqu'à 20 à 30 cm. Dans les pays africains on peut semer à n'importe quelle saison de l'année, mais si l'on sème en saison sèche il faut généreusement arroser jusqu'au repiquage.

LA RECOLTE

Classiquement **La récolte des feuilles** doit se faire dès le bourgeonnement des fleurs, avant la pleine floraison, car la concentration en artémisine est maximum au moment du bourgeonnement et décroît rapidement après la floraison. En fait des travaux récents ont montré que la teneur en artémisine n'est pas un élément essentiel, et on peut faire la récolte jusqu'en fin de floraison. La récolte se fait habituellement 4 à 5 mois après la plantation.

Dans une étude faite à Longeville, où le bourgeonnement s'est produit durant les derniers jours du mois d'Août, la teneur des feuilles en artémisine était de 0,13% le 16 Août, de 0,31% le 26 Août, de 0,31% le 2 Septembre, et de 0,25% le 9 Septembre. Il faut donc récolter les feuilles juste avant la floraison (fig 3). Il peut être difficile de déterminer précisément la phase de transition entre les feuilles et la floraison, car les feuilles ont tendance à disparaître au moment du bourgeonnement ; de plus les fleurs sont de très petite taille, avec une coloration jaunâtre, et il est souvent délicat de les différencier de petites feuilles.



Fig 3. La plante est à maturité et les feuilles peuvent maintenant être récoltées.

Le procédé de récolte le plus simple consiste à couper et rassembler les plants, puis les étaler sur un tissu pour le séchage. La concentration en artémisine est nettement plus importante dans les feuilles sèches que dans les feuilles vertes, notamment en cas de récolte précoce (42), et le séchage est donc indispensable.

Le mode de séchage est discuté dans la littérature, l'exposition au soleil étant néfaste pour certains (Laughlin, 37) et au contraire favorable pour d'autres (Simonnet, 65). Dans une étude faite par ACP-Paludisme, la teneur en artémisine est de 0. 30% quand les plants sont séchés au soleil et de 0. 36% quand ils sont séchés à l'ombre, suggérant qu'il est préférable d'éviter l'exposition au soleil. Ferreira (21) a comparé différents modes de séchage : séchage à l'ombre pendant 1 à 3 semaines, séchage au soleil pendant 1 à 3 semaines, séchage au four à 45° avec ventilation pendant 12 à 24 h et séchage par lyophilisation. Il a constaté que le mode de séchage, à l'ombre ou au soleil, ne modifie pas sensiblement la teneur en artémisine. Par contre le séchage au four, néfaste pour la teneur en artémisine, est plus efficace pour préserver l'activité anti-oxydante des feuilles. Quelque soit le mode de séchage, la teneur en artémisine augmente pendant les trois premiers jours, sa biosynthèse étant déclenchée par le séchage. Lorsque la plante est sèche, il faut détacher les feuilles des tiges. Les feuilles contiennent surtout l'artémisine, mais elles ne sont pas seules à contenir les principes actifs ; les tiges contiennent notamment les flavonoïdes et il est préférable de garder les petites tiges sur lesquelles s'attachent les feuilles. Ceci peut se faire en frappant les plants contre une surface dure, ou mieux encore en empaumant les plants à leur base et en arrachant les feuilles en remontant la main de bas en haut le long de la tige. Ces techniques ont l'inconvénient de fragmenter les feuilles en fines particules. On peut piler les feuilles jusqu'à obtention d'une poudre fine que l'on peut conserver dans des récipients ou sacs en plastique opaques.

Un autre procédé consiste à laisser la tige sur pied et arracher chaque tigelle une par une, puis faire sécher à l'ombre (fig. 4). Le procédé est nettement plus long, mais les feuilles gardent leur aspect normal et surtout elles ont une forte teneur en artémisine (0. 84% dans l'étude faite par ACP-Paludisme). Enfin après séchage il faut stocker les feuilles dans des sacs en tissu opaque dans un endroit frais et à l'ombre, et il faut impérativement éviter une ré-humidification de la récolte, qui influe fortement sur la dégradation de l'artémisine.

La récolte des graines ne doit être faite ni trop tôt car elles risquent de ne pas être arrivées à maturité, ni trop tard car elles risquent de tomber par terre et d'être perdues. A Longeville le meilleur moment pour la récolte des graines se situe en automne, juste avant les premières gelées. Le procédé le plus simple consiste à couper les tiges et les secouer contre un plan dur ou les battre pour faire tomber les graines.

Fig 4.

A Madagascar, la récolte des feuilles vertes est faite directement sur la plante.



A noter que si l'on récolte les feuilles juste avant la floraison, on risque de compromettre la récolte de graines. Lorsque l'on commence une plantation d'*Artemisia annua*, il faut donc ne pas récolter toutes les feuilles et conserver une partie des plants pour récolter ultérieurement les graines. On peut repérer quelques pieds et les identifier avec un tissu ou une marque quelconque pour les conserver jusqu'à la floraison. Quand les graines sont en formation, on peut enfermer les terminaisons florales (sans les serrer) dans un petit sac en plastique percé de trous, afin d'éviter la dissémination des graines et de limiter les impuretés.

LE CYCLE PARASITAIRE DU PLASMODIUM FALCIPARUM

Résumé : En piquant l'homme, le moustique lui injecte dans le sang sa salive infectée par le parasite. Le parasite gagne d'abord le foie où il se multiplie. Puis, les parasites migrent dans le sang où ils pénètrent dans les globules rouges et les détruisent. Si un moustique sain pique un homme infecté, il s'infecte à son tour et va transmettre la maladie à d'autres humains.

Le parasite (le plus fréquent est le Plasmodium Falciparum, responsable des formes de paludisme les plus graves) se développe en deux cycles : un cycle asexué chez l'homme et un cycle sexué chez le moustique.

1) Chez l'homme : cycle asexué (ou schizogonique).

En piquant l'homme, le moustique lui injecte sa salive qui contient des centaines de parasites (appelés sporozoïtes) provenant de ses glandes salivaires. Les parasites gagnent le foie et pénètrent dans les cellules hépatiques où ils se multiplient, grossissent et finissent par faire éclater la cellule hépatique. Ils repassent alors dans la circulation sanguine (ils sont alors appelés mérozoïtes) et pénètrent dans les hématies (ou globules rouges) ; ils deviennent alors des trophozoïtes d'abord jeunes, à forme annulaire ; les trophozoïtes grossissent, dégradent l'hémoglobine du globule rouge et se multiplient dans le globule rouge ; on parle alors de schizontes. Quand il est mûr, le schizonte éclate et libère de nouveaux mérozoïtes qui vont eux-mêmes parasiter des hématies vierges et recommencer le cycle ; chaque cycle dure 48 heures et l'éclatement des globules rouges et des schizontes est contemporain des accès fébriles. Enfin, après plusieurs cycles, on voit apparaître dans les hématies des parasites sexués, les gamétocytes mâles et femelles.

2) Chez le moustique (l'anophèle) : cycle sexué (ou sporogonique).

Lorsqu'il pique un homme infecté, le moustique ingère des schizontes, des mérozoïtes et des gamétocytes. Les schizontes et les mérozoïtes sont digérés dans l'estomac du moustique. Le gamétocyte femelle est fécondé par le gamétocyte mâle, formant un œuf (l'oocyste) qui traverse la paroi de l'estomac du moustique et se fixe sur cette paroi. Dans l'oocyste se forment des sporozoïtes qui sont libérés par l'éclatement de l'oocyste et gagnent les glandes salivaires. La durée du cycle chez l'anophèle est de 10 à 40 jours.

Lorsque la population est régulièrement exposée à un risque d'inoculation élevé (comme c'est le cas en Afrique subsaharienne), les accès de paludisme les plus graves sont l'apanage des enfants ; en effet une immunité clinique partielle s'acquiert durant l'enfance, et les adolescents ou adultes ne présentent que peu d'accès palustres, mais le parasite reste présent dans leur sang de façon chronique. Ce fait particulièrement important est bien précisé dans le rapport de Olumnese sur le traitement du paludisme (57, pp 5-6) et il mérite d'être pris en considération dans l'évaluation de l'efficacité des traitements proposés, bien que la position « officielle » de l'OMS soit de considérer à la fois le résultat clinique et le résultat biologique dans l'évaluation des résultats.

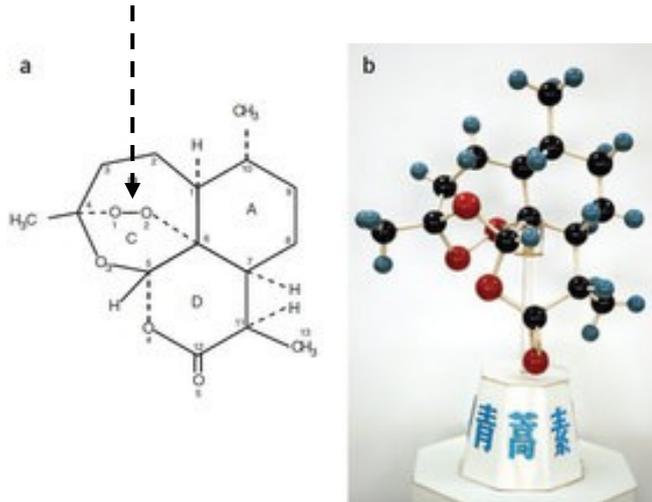
LE MECANISME D'ACTION DE L'ARTEMISINE

La molécule d'artémisine a été isolée sous forme cristalline en 1972 ; sa structure chimique a été déterminée en 1979 : c'est un sesquiterpène lactone avec un pont endoperoxyde (pont reliant deux atomes d'oxygène). C'est une molécule à haute énergie, prompte à réagir et à perdre son énergie car peu stable (32).

La molécule d'artémisine.

Le pont endoperoxyde (O-O) est l'élément essentiel pour l'activité de l'artémisine. En présence de Fer, le pont se rompt et libère des radicaux libres qui bloquent la synthèse des protéines du parasite (par inhibition de la CA^{++} ATPase), ce qui tue le parasite.

Le pont peroxyde. Il réunit deux atomes d'oxygène.



Des dérivés semi-synthétiques ont été préparés à partir de la molécule d'artémisine: dihydroartémisine, artemether, artesunate and arteether. La durée de vie de ces dérivés est nettement inférieure à celle de l'artémisine, quelques mois pour l'artesunate (29), et leur efficacité n'est pas sensiblement supérieure à celle de l'artémisine. L'avantage de l'artesunate est d'être hydrosoluble et d'être facilement utilisable par voie intraveineuse.

Les feuilles doivent impérativement être conservées à l'obscurité, dans un endroit sec et frais. Selon une expérience communiquée par P Lutgen (non publiée), dans une tisane qui contenait initialement 1.08 % d'artémisine, la concentration reste constante après 7 semaines de conservation à 25°C et 65% d'hygrométrie, de même qu'à 35° C et 75% d'hygrométrie. Après 39 mois, la concentration reste à 0.78 % après conservation à 25° C et 65% d'hygrométrie, mais s'effondre après conservation à 35° C et 75% d'hygrométrie. Pour le même échantillon gardé au réfrigérateur à 4° C la concentration en artémisine est de 0.90 %.

Contrairement à ce que l'on pensait (27), les feuilles séchées ont une bonne stabilité et leur teneur en artémisine reste satisfaisante à trois ans. La durée de conservation des feuilles d'artémisine est longue à condition qu'elles soient conservées au sec et à l'ombre et elle peut atteindre deux à trois ans (P Lutgen, comm partic). Par contre la durée de conservation de la tisane est brève et son efficacité diminue rapidement après l'infusion des feuilles, surtout quand elle est conservée à température ambiante ; il faut donc utiliser de la tisane fraîchement préparée, datant de 24 heures au maximum. L'artémisine a un rôle anti-inflammatoire et antipyrétique ; elle est active non seulement sur le Plasmodium Falciparum, mais également

sur de nombreuses bactéries et virus (elle a été utilisée avec succès dans la désinfection de l'eau (43) et sur certaines parasitoses comme les leishmanioses ou les schistosomiasis (62). Enfin elle a un rôle dans le freinage de la prolifération cellulaire cancéreuse⁴ (22, 36, 52).

⁴ L'effet anticancéreux de l'artémisine est un sujet particulièrement « brûlant ». Cet effet a été prouvé à plusieurs reprises *in vitro*, sur des lignées de cellules cancéreuses provenant de différentes origines : sein, poumon, rein, ovaire, prostate, colon, tissu hématopoïétique (1, 2). Cependant il n'a pas été rapporté d'études cliniques sur l'efficacité de l'artémisine contre le cancer, et on ne peut s'appuyer que sur des rapports d'observations isolées. L'artémisine agirait selon différents processus (3): mort des cellules cancéreuses (apoptose), inhibition de la prolifération cellulaire cancéreuse, inhibition de l'angiogénèse, freinage de la migration cellulaire cancéreuse. Le mécanisme d'action se rapproche du mécanisme observé dans le paludisme (4,5) : la molécule d'artémisine est activée en présence de Fer qui ouvre le pont peroxyde, libérant des radicaux libres qui tuent la cellule cancéreuse. Les cellules cancéreuses sont naturellement riches en Fer (celui-ci est nécessaire pour leur prolifération) et elles sont donc plus sensibles à l'effet cytotoxique de l'artémisine que les cellules normales. On a pu expérimentalement fixer la molécule d'artémisine sur des molécules de transferrine, porteuses de Fer (10) ; la transferrine est captée par la cellule cancéreuse et la pénètre, introduisant en même temps le Fer et l'artémisine ; dans la cellule le Fer est libéré et l'artémisine l'utilise pour libérer des radicaux libres et tuer la cellule... Le rôle du Calcium a également été mis en évidence (6). En fait dans la tisane l'artémisine n'est pas seule. Il existe de nombreuses autres molécules: les flavonoïdes qui sont présents dans les feuilles d'*Artemisia annua*, mais également en grandes quantités dans les tiges. Les flavonoïdes ont une action anticancéreuse propre (7). Certains inhibent l'angiogénèse, d'autres inhibent la prolifération cancéreuse. Mais les flavonoïdes ont aussi une action synergique de l'artémisine: Ils sont antioxydants et facilitent l'activation de l'artémisine et la libération des radicaux libres. L'effet cytotoxique a été retrouvé *in vitro* sur différentes cultures cellulaires cancéreuses : cancer du sein (8), cancer du poumon (9), lymphocytes (10,11). L'artémisine aurait un effet anti-oestrogénique spécifique, en bloquant les récepteurs oestrogéniques sensibles de cultures de cellules tumorales de cancer du sein (12). En l'absence d'études précises, la posologie n'est pas nettement définie ; on conseille habituellement un litre de tisane par jour, préparé avec une bonne cuillerée à soupe de feuilles, mais il est possible qu'un bol soit suffisant.

1. Efferth T, Dunstan H, Sauerbrey A, Miyachi H, Chitambar CR. The anti-malarial artesunate is also active against cancer. *Int J Oncol.* 2001 ;18 : 767-73.
2. Efferth T. Antiplasmodial and antitumor activity of artemisinin--from bench to bedside. *Planta Med.* 2007 ; 73 : 299-309.
3. Firestone GL, Sundar SN. Anticancer activities of artemisinin and its bioactive derivatives. *Expert Rev Mol Med.* 2009, 30;11: e32.
4. Lai H, Sasaki T, Singh NP. Targeted treatment of cancer with artemisinin and artemisinin-tagged iron-carrying compounds. *Expert Opin Ther Targets.* 2005 ; 9 : 995-1007.
5. Lai H, Singh NP. Oral artemisinin prevents and delays the development of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced breast cancer in the rat. *Cancer Lett.* 2006 Jan 8;231(1):43-8.
6. Mu D, Zhang W, Chu D, Liu T, Xie Y, Fu E, Jin F. The role of calcium, P38 MAPK in dihydroartemisinin-induced apoptosis of lung cancer PC-14 cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2008 ; 61 : 639-45.
7. Ferreira JFS, Luthria DL, Sasaki T, Heyerick A. Flavonoids from *Artemisia annua* as antioxidants and their potential synergism with artemisinin against malaria and cancer. *Molecules* 2010, 15, 3135-3170.
8. Singh NP, Lai H. Selective toxicity of dihydroartemisinin and holotransferrin toward human breast cancer cells. *Life Sci* 2001 ; 70 : 49-56.
9. Lu YY, Chen TS, Qu JL, Pan WL, Sun L, Wei XB. Dihydroartemisinin (DHA) induces caspase-3-dependent apoptosis in human lung adenocarcinoma ASTC-a-1 cells. *Biomed Sci.* 2009 ;16:16.
10. Zhou HJ, Wang Z, Li A. Dihydroartemisinin induces apoptosis in human leukemia cells HL60 via downregulation of transferrin receptor expression. *Anticancer Drugs.* 2008 ; 19 : 247-55.
11. Lai H, Sasaki T, Singh NP, Messay A. Effects of artemisinin tagged holotransferrin on cancer cells. *Life Sci* 2005 ; 76 : 1267-79.
12. Sundar SN, Marconett CN, Doan VB, Willoughby WA, Firestone GL. Artemisinin selectively decreases functional level of oestrogen receptor-alpha and ablates oestrogen-induced proliferation in human breast cancer cells. *Carcinogenesis*, 2008 ; 29 : 2252-58.

Dans le cas du paludisme, l'artémisine est active sur les trophozoïtes jeunes (1) et évite l'évolution vers les stades de trophozoïtes plus tardifs, où le parasite adhère à l'endothélium vasculaire ; ce phénomène est appelé séquestration et il se produit dans les microvaisseaux des organes vitaux et notamment du cerveau. Ce stade de séquestration est considéré comme responsable des complications de l'accès palustre et notamment du neuropaludisme, avec adhérence des hématies parasitées à la paroi des veinules postcapillaires du cerveau, inflammation et hémorragies autour des vaisseaux, le coma étant dû à l'accumulation dans les capillaires cérébraux d'un grand nombre d'hématies parasitées, responsables de troubles métaboliques par production de toxines. L'artémisine pénètre dans les globules rouges parasités et stoppe précocément la maturation des schizontes. L'artémisine a également un effet gamétocytocide supérieur aux antipaludéens classiques (Okell, 56), diminuant ainsi le risque de transmission du parasite de l'homme au moustique. Cet effet gamétocytocide est de grande importance, car les gamétocytes peuvent persister dans le sang de façon latente, en particulier chez l'enfant, qui peut rester contagieux longtemps après la guérison de l'accès palustre (Barnes, 11).

Son mode d'action reste encore incomplètement connu. Plusieurs mécanismes semblent s'associer (24). Certains sont spécifiques : perturbation dans le métabolisme des protéines du parasite et perturbation de l'activité mitochondriale du parasite. D'autres sont non spécifiques, notamment un effet sur le système immunitaire et un rôle d'inhibition de l'angiogénèse.

1) Perturbation dans le métabolisme des protéines du parasite. Le mécanisme fondamental serait l'inhibition d'un enzyme, la Ca^{++} ATPase qui intervient dans la synthèse des protéines des membranes cellulaires du parasite (19). La Ca^{++} ATPase est présente dans le réticulum endoplasmique du parasite ; elle assure le maintien de la concentration en ions Ca^{++} dont le rôle est fondamental pour la synthèse des protéines. L'artémisine se fixerait sur la Ca^{++} ATPase en laissant disponible le pont peroxyde ; celui-ci est rompu en présence d'ions Fe^{++} (car le Fer attire un électron de l'oxygène). Les atomes d'oxygène sont alors activés et ils attirent des ions H^+ , libérant ainsi des radicaux libres de carbone. Ces radicaux libres inhibent l'ATPase, ce qui entraîne la mort du parasite.

Le Fer semble provenir de l'hème, c'est-à-dire du produit de dégradation de l'hémoglobine consécutive à l'infestation des globules rouges par le parasite. Il s'agirait de l'hème intraparasitaire ; celle-ci activerait l'artémisine et libérerait les radicaux libres de carbone dans le parasite, ce qui peut expliquer la toxicité sélective de l'artémisine sur le parasite (Meshnick, 48). Mais il est possible que le Fer ait également une autre origine, car l'artémisine agit précocément dans le cycle parasitaire, avant la dégradation de l'hémoglobine.

Par ailleurs l'artémisine est retrouvée également dans les structures membraneuses du parasite (réticulum endoplasmique, système mitochondrial), et non pas uniquement dans les vacuoles cytoplasmiques où se trouve l'hème, ce qui suggère d'autres mécanismes d'action.

2) Perturbation de l'activité mitochondriale du parasite. Le système mitochondrial est nécessaire pour la chaîne respiratoire du parasite (apport d'oxygène) et pour sa croissance. L'artémisine serait activée par le fer contenu dans la mitochondrie, selon le processus décrit ci-dessus ; les atomes d'oxygène du pont peroxyde ainsi activés perturberaient le transport des électrons dans la mitochondrie, provoquant une dépolarisation de la membrane mitochondriale. Ceci empêche la biosynthèse des protéines nucléiques du parasite, et notamment de la pyrimidine, aboutissant à la mort du parasite (Maeno, 45).

3) Rôle d'inhibition de l'angiogénèse : Il s'agit de la prolifération cellulaire inflammatoire réactionnelle à l'agression du parasite qui adhère à l'endothélium vasculaire, en particulier au niveau des petits vaisseaux (phénomène de la séquestration). L'artémisine aurait un effet favorable sur l'œdème et les hémorragies liées à l'inflammation vasculaire. Cet effet est particulièrement bénéfique car il atténue la sévérité du paludisme cérébral.

L'EFFICACITE DE L'ARTEMISINE

On trouve dans la littérature de très nombreux travaux consacrés à l'artémisine et à son action. La plupart de ces travaux concernent l'artémisine elle-même, extraite industriellement de l'*Artemisia annua*, ou ses dérivés semi-synthétiques, mais on trouve également quelques études sur l'efficacité de l'artémisine présente dans l'infusion de feuilles d'*Artemisia annua*. Actuellement cependant l'intérêt se porte sur les nombreuses autres molécules présentes dans l'*Artemisia annua*, dont le pouvoir antipaludéen a peut-être été négligé.

Le taux d'artémisine contenu dans les feuilles dépend de plusieurs facteurs, et notamment de la variété d'*Artemisia annua*, du moment de la récolte, du mode de séchage, de la durée de conservation, et surtout du mode de conservation des feuilles qui semble avoir un rôle prépondérant. Les concentrations relevées dans la littérature varient entre 0,10% et 1%. A Madagascar nous avons obtenu 0,50%. Au Sénégal différentes variétés ont été étudiées, parmi lesquelles les variétés brésilienne, Anamed et Médiplant. La concentration était de 0,63% dans l'étude de Mueller (38). La concentration en artémisine ne semble cependant pas être un facteur fondamental pour son pouvoir antipaludéen : Omar Gueye (58) retrouve in vitro une efficacité identique avec de la tisane à base de feuilles brésiliennes à concentration voisine de 1% et avec de la tisane à base de feuilles luxembourgeoises, dans lesquelles la concentration n'est que de 0,2% ; il explique cela par la présence d'autres molécules dans la tisane. Dans une expérience au Burkina Faso, nous avons obtenu immédiatement après la récolte une concentration initiale de 0,30% ; après un an le taux avait chuté à 0,12%, mais avec des conditions de conservation mal précisées. Les feuilles situées à la partie supérieure du plant sont plus riches en artémisine (61). Les concentrations relevées dans la littérature varient entre 0,10% et 1%. A Madagascar nous avons obtenu 0,50%. Au Sénégal différentes variétés ont été étudiées, parmi lesquelles les variétés brésilienne, Anamed et Médiplant. Dans toutes ces variétés le taux était supérieur à 0,8%, allant jusqu'à 1,3% dans la variété Mediplant. La concentration était de 0,63% à 0,70% dans l'expérimentation de Mueller (50). L'hybridation de l'*Artemisia annua* semble beaucoup augmenter la concentration en artémisine. Cependant l'hybridation semble compromettre la production de graines. Enfin une fertilisation avec le phosphore pourrait avoir un rôle favorable en augmentant la concentration en artémisine (33).

La quantité de feuilles recommandée pour la préparation en tisane est de 9 à 10 grammes de feuilles pour un litre d'eau bouillante ; cependant Mueller (51) et Blanke (13) ont utilisé une infusion contenant 5 grammes de feuilles avec des résultats cliniques identiques. Il semble préférable de verser l'eau bouillante sur les feuilles et non pas de jeter les feuilles dans l'eau ;

il ne faut surtout pas poursuivre l'ébullition avec les feuilles, car cela détruit l'artémisine : dans les expérimentations de Rãth (60) et Mueller (50), la concentration en artémisine est deux à trois fois moins importante lorsque la tisane est maintenue à ébullition (de 5 à 30 minutes). Il faut si possible utiliser un récipient en plastique ou mieux en verre pour faire infuser, et éviter un récipient en fer (le fer réagissant avec l'artémisine). Après avoir versé l'eau bouillante sur les feuilles, Rãth (60) conseille de remuer le mélange (avec une cuiller en bois), puis de laisser infuser 10 minutes, le récipient étant recouvert ; il faut ensuite filtrer la tisane, presser les feuilles pour récupérer les reliquats d'artémisine dissoute, et enfin laisser refroidir la tisane. Avec ce protocole, Rãth obtient une quantité d'artémisine de 94,5 mg/l avec 9 g de feuilles ; avec 5 g de feuilles il obtient une quantité de 60 mg/l. Avec un protocole similaire, Mueller (50) obtient 12 mg/l d'artémisine avec 5 g de feuilles, 24 mg/l avec 10 g, 32 mg/l avec 20 g, et 64 mg/l avec 40 g de feuilles. Jansen (31) a mesuré 24,2 mg/l, mais avec une méthode d'analyse critiquable. Selon Mueller 40% de l'artémisine présente dans les feuilles peut être extraite dans la tisane, ce qui représente 40 mg si l'on considère une concentration de 1% dans une quantité de 10 g de feuilles. Il est reconnu que l'artémisine est peu soluble dans l'eau, et le bon rendement obtenu avec la préparation en tisane s'explique par la présence dans les feuilles d'autres constituants (flavonoïdes, saponines, polysaccharides...) qui favoriseraient la dissolution de l'artémisine en agissant comme détergents (72), ou avec lesquels l'artémisine pourrait former des complexes hydro-solubles. Si l'on rapproche ces chiffres de la dose quotidienne habituellement prescrite d'artémisine ou de ses dérivés, qui est de 500 mg, on peut considérer que l'apport en artémisine par l'ingestion de tisane est très insuffisant ; cependant il faut préciser qu'il n'existe pas d'étude argumentée pour confirmer la nécessité d'une posologie de 500 mg ; de même la quantité de feuilles habituellement conseillée (9g/l) est arbitraire et peut parfaitement être augmentée ou diminuée. Ashton (8) a même constaté une efficacité identique dans une étude comparant l'artémisine administrée par voie orale et l'artémisine administrée par voie rectale aux mêmes doses, bien que le coefficient d'absorption de cette dernière voie soit nettement inférieur à celui de la voie orale, ce qui suggère qu'une dose initiale de 500 mg est probablement excessive.

La concentration plasmatique maximum, après absorption de 500 mg d'artémisine extraite (sous forme de comprimés), est obtenue très rapidement, entre deux et 3 heures, et elle dépasse le plus souvent 200 microgr/l (33); elle était de 615 µg/l dans l'étude de Alin (4) ; elle était de 391 µg/l dans l'étude faite par Duc (18) et de 364 µg/l dans le travail de Vries (69). La concentration plasmatique maximum après absorption d'une tisane contenant 9 g de feuilles d'*Artémisia annua* (soit environ 30 à 40 mg d'artémisine) a été étudiée par Rãth (60) qui a noté une concentration de 240 µg/l. Cette concentration élevée suggère que l'artémisine naturelle présente dans la tisane est mieux absorbée que l'artémisine en comprimés. Il faut insister sur le fait que la tisane contient d'autres composés que l'artémisine, qui augmentent probablement son absorption. Enfin, dans l'étude de Vries (69), la concentration efficace in vitro pour inhiber 50 % de croissance du plasmodium falciparum est de 3 à 30 microgr/l ; selon Alin (3) et Heide (28) la concentration minimum nécessaire est de 10 µg/l. Ces chiffres sont donc très nettement inférieurs aux concentrations plasmatiques mesurées après ingestion de tisane.

In vitro, Alin a constaté que la croissance du Plasmodium était inhibée à raison de 63% après 3 heures d'exposition à l'artémisine, l'inhibition atteignant 95% après un délai de 48 heures ; une exposition durant 12 heures provoquait une inhibition de croissance de 100%. In vivo, le

temps nécessaire à l'élimination du parasite est d'environ 36 heures: il était de 26 heures dans l'étude de Alin (5), de 48 heures dans l'étude de Mueller (4), et de 36 heures dans l'étude de de Vries (69). Cependant la durée de vie de l'artémisine est courte, avec une demi-vie moyenne de 2 heures et demie à trois heures (4,18,25). Ainsi le traitement par artémisine est presque immédiatement efficace ; il permet de réduire considérablement la concentration en parasites, pratiquement au-dessous des valeurs détectables, mais sans élimination totale, et la croissance des quelques parasites restants expose à une récurrence précoce de la parasitémie et surtout à une récurrence clinique de l'accès palustre. Ce risque, confirmé dans la plupart des études portant sur l'artémisine ou sur la tisane d'*Artemisia annua*, nécessite de prolonger sur plusieurs jours le traitement par tisane. On trouve cependant dans la littérature une étude comparative moins optimiste (Atemnkeng,9), effectuée sur des souris, dans laquelle la parasitémie au 4^{ème} jour était de 50 % dans le groupe traité par tisane, contre 3 % dans un groupe traité par artésunate ; par ailleurs toutes les souris traitées par tisane étaient décédées au 11^{ème} jour alors que 83 % des souris traitées par artésunate étaient survivantes.

L'efficacité clinique de la tisane de feuilles d'*Artemisia annua* dans le traitement du paludisme a été démontrée à l'occasion du traitement de plusieurs cas isolés (communications personnelles), tous avec une rapide et complète amélioration clinique. L'efficacité de la tisane a également été étudiée dans quelques séries randomisées de la littérature: Chougouo Kengne (16) rapporte une étude récente comparant tisane et artésunate seul ou associé à amodiaquine, mais sans que soit nettement précisé le matériel d'étude: le taux d'échecs était de 0 % en cas de traitement par la tisane durant 7 jours, mais de 28 % en cas de traitement durant 5 jours ; il était de 12 % et 14 % avec l'artésunate seul ou associé à l'amodiaquine. Dans une étude récente portant sur 3000 cas, dont 250 enfants âgés de moins de 5 ans, Willcox (76) rapporte une efficacité constante de la tisane, sans effets secondaires notables chez les enfants ni chez les femmes enceintes (24 cas traités durant le premier trimestre de gestation). Par contre l'auteur signale des difficultés dans la culture de l'*Artemisia annua* dans près de la moitié des cas (au Kenya et en Ouganda). Fouda (23) rapporte une étude brésilienne portant sur 72 patients traités par tisane (1 litre/jour avec 5g de feuilles pendant 7 jours : le pourcentage d'éradication du parasite dans le sang était de 4,3% à J1 de traitement, de 47,7% à J2, de 85,9% à J7, et de 93,7% à J14 de traitement. Blanke (13) rapporte 10 cas traités par tisane ; Mueller (50,51) rapporte deux séries, l'une de 53 patients, l'autre de 72 patients. Dans ces dernières études une importante amélioration clinique a été observée dans presque tous les cas dès le troisième jour du traitement. Dans les trois études la parasitémie avait disparu dans 70% des cas au 7^{ème} jour. Cependant les auteurs ont noté une récurrence de la parasitémie au 28^{ème} jour dans un nombre important de cas, variant de 70% à 90% selon les séries. Ces cas de réapparition de la parasitémie, attribués à la brièveté de la demi-vie de l'artémisine, ont été considérés comme des échecs, même en l'absence de récurrence de la symptomatologie clinique. En raison de la fréquence de cette recrudescence précoce de la parasitémie, le traitement du paludisme par l'artémisine seule ou ses dérivés, et donc a fortiori par la tisane d'*Artemisia annua*, est considéré par l'OMS comme un traitement insuffisant, et pour cette raison le traitement de l'accès palustre par l'artémisine seule est « officiellement » considéré comme inacceptable.

Cependant la constatation d'une parasitémie modérée sans symptomatologie clinique est classique chez l'enfant en zone d'endémie, et il est admis que cela lui apporte une immunité antitoxique et lui assure une protection minimale contre les infections ultérieures. Selon l'étude de Bottius (14) qui porte sur une population en zone d'endémie, 50 % des sujets testés présentaient une parasitémie microscopique, mais le chiffre s'élevait à 90 % avec des

techniques plus sensibles (polymerase chain reaction). Ainsi une parasitémie isolée notée après traitement d'un accès palustre ne paraît pas très significative et plusieurs publications ont souligné ce fait : Mueller (50), Silachamroon (64), Swarthout (67), Whitty (72) ont retrouvé entre la 4^{ème} et la 6^{ème} semaine une parasitémie variable de 20% à 50% selon les dérivés d'artémisine utilisés, isolément ou en combinaison. Au recul de 6 semaines, il est d'ailleurs difficile d'attribuer cette parasitémie à une récurrence (donc à un échec du traitement) ou à une réinfestation (la distinction nécessiterait une étude génotypique du parasite). Dans l'étude très complète de Ashley (6) portant sur une population de 2926 enfants traités par ACT, une récurrence de la parasitémie a été observée dans 942 cas entre le 14^{ème} et le 28^{ème} jour, attribuée à une récurrence dans 12% des cas et à une réinfestation dans 78% des cas, avec un taux d'échecs variant de 0% à 40% selon la méthodologie statistique utilisée. Au total on peut considérer que la persistance ou la récurrence d'une parasitémie modérée n'est pas significative dès lors qu'elle est isolée et sans symptomatologie clinique. Malgré ses imperfections, le traitement de l'accès palustre par tisane d'artémisine peut donc être recommandé lorsqu'il n'existe pas d'alternative accessible (61), l'objectif du traitement par tisane d'artémisine n'étant pas d'éradiquer définitivement la maladie, mais de traiter l'accès palustre et de prévenir ses complications (Willcox,78).

Par ailleurs, il semble également que l'*Artemisia annua* ait non seulement un effet curatif, mais également un effet préventif du paludisme (peut-être à cause des autres constituants que l'artémisine ?). Ogowang (12) a fait une étude longitudinale durant 8 mois, portant sur environ 300 patients prenant un bol de tisane une fois par semaine; il observe une diminution de 80% des symptômes attribuables au paludisme.

On voit que les très nombreuses recherches qui ont été effectuées après l'isolement de la molécule d'artémisine sont restées centrées sur cette molécule, qui a été considérée sans doute à tort comme la seule molécule efficace contre le paludisme. Cependant, on sait que l'*Artemisia Annua* contient en outre un véritable cocktail de molécules de flavonoïdes (scopolétine, casticine, chrysoplenetine, chrysosphenol-D, cirsilineol...). Ces flavonoïdes se trouvent dans les feuilles, mais également et peut-être à concentration plus importante dans les tiges de la plante (79). Les flavonoïdes résistent à l'eau bouillante (à la différence de l'artémisine). Ils ont un important pouvoir antioxydant (ce sont des chélateurs du Fer, transformant les ions Fe+++ en ions Fe++). Or les antioxydants semblent avoir un rôle dans la prévention de paludisme. Akpotuzor (2) et Metzger (49) constatent que le taux d'antioxydants (vitamines A et C, carotènes) est diminué chez des enfants impaludés et que ces taux augmentent avec la guérison de l'accès palustre.. Certains flavonoïdes (quercétine, luteoline, apigénine) inhibent précocément la croissance du Plasmodium Falciparum au stade de trophozoïte intraérythrocytaire (40). A doses faibles ces molécules, comme notamment la quercétine, potentialisent l'action de l'artémisine, peut-être en inhibant des enzymes catalyseurs de l'artémisine (22). Ashton (7) avait observé que, avec un traitement quotidien continu par artémisine pure, la concentration plasmatique en artémisine diminue avec le temps, passant à 34% au 4^{ème} jour de traitement et à 24% au 7^{ème} jour de traitement, et il évoquait la possibilité de l'induction par l'artémisine de la production d'enzymes auto-destructeurs (cette diminution de la concentration plasmatique en artémisine peut d'ailleurs expliquer la récurrence de la parasitémie qui s'observe dans 2% à 50% des cas au 28^{ème} jour après un traitement par artémisine seule). Selon Ferreira (22) ces enzymes (et notamment le CYP450) sont détruits par les flavonoïdes présents dans l'*Artemisia annua*. Les flavonoïdes favoriseraient ainsi l'efficacité des molécules d'artémisine qui resteraient actives plus longtemps dans l'organisme. De plus les flavonoïdes auraient une action synergique de

l'artémisine, en favorisant la pénétration de l'artémisine à travers les membranes cellulaires du parasite. Enfin, à doses fortes les flavonoïdes ont une action antipaludéenne directe sur le *Plasmodium falciparum* (76,82), les terpènes comme le limonène ou le farnésol inhibant le développement du *Plasmodium Falciparum* par leur pouvoir anti-oxydant (10,26). De même, le 1,8 cineole, présent dans l'*Artemisia annua*, inhibe le développement et la croissance du *Plasmodium Falciparum*, dont le développement est stoppé au stade de trophozoite intra-érythrocytaire (66).

Enfin, on accorde actuellement un rôle important aux polysaccharides présents dans l'*Artemisia annua* (82). Ils favoriseraient la solubilité de l'artémisine et des flavonoïdes. Ils ont un effet anti-inflammatoire. De plus les polysaccharides sulfatés présents dans l'*Artemisia annua* empêcheraient l'invasion des érythrocytes par le parasite à un stade précoce de mérozoite. A l'inverse, les monosaccharides, ou sucres simples (glucose, lactose), semblent à déconseiller car ils favoriseraient le développement du parasite, qui en a besoin pour son métabolisme. Il faut donc éviter l'addition de sucre ou de miel dans la tisane, addition qui a été suggérée pour diminuer l'amertume de la tisane et la rendre plus acceptable pour les enfants...

Le traitement par tisane n'est donc pas une monothérapie, mais plutôt une véritable polythérapie, et peut-être les recherches ont-elles négligé ces différentes molécules au profit de l'artémisine elle-même. Cette polythérapie peut expliquer certains paradoxes entre l'utilisation de l'artémisine pure et l'utilisation des extraits d'*Artemisia annua* :

- Les doses d'artémisine dans la tisane sont très inférieures aux doses recommandées en cas de traitement par la molécule d'artémisine elle-même, et pourtant les résultats sont au moins aussi bons.
- On a montré que la molécule d'artémisine est très peu soluble dans l'eau, et pourtant la préparation d'*Artemisia annua* en tisane est très efficace.
- On a constaté le développement de résistance du parasite à l'artémisine ou à ses dérivés, même associés à des molécules à action plus lente (6, 70). Les premiers cas de résistance ont été observés au Cambodge avec l'artesunate (17) et pourtant il n'a pas été retrouvé de cas de résistance après traitement par tisane. Cette polythérapie peut expliquer que le *Plasmodium Falciparum* ne soit pas devenu résistant à l'artémisine, malgré deux millénaires d'utilisation de la tisane.
- La teneur en artémisine est très variable selon les souches d'*Artemisia annua*, de 0,1 % à plus de 1 % pour la variété brésilienne (la teneur en artémisine de l'*Artemisia annua* produite par ACP est de l'ordre de 0,50%), et pourtant les résultats dans le traitement de l'accès palustre sont équivalents.

Pour éviter une monothérapie qui pourrait être une cause de résistance du parasite, et pour diminuer le risque de récurrence, l'OMS recommande d'associer à l'artémisine des antipaludéens classiques, à action plus lente, et il existe actuellement plusieurs préparations pharmaceutiques, mais qui sont toutes trop coûteuses pour un usage universel. Par ailleurs ces médicaments à action plus lente sont connus pour être pour la plupart devenus inefficaces en face du *Plasmodium Falciparum*. En fait, la brièveté de la demi-vie de l'artémisine est considérée par certains comme un élément favorable, le parasite n'ayant pas le temps de développer de résistance. Pour compenser cette brièveté, la durée du traitement par tisane doit être impérativement d'au moins 5 jours (38) ; la durée habituellement recommandée est de 7 jours.

L'ADMINISTRATION DE L'ARTEMISINE

1) La préparation de la tisane

La quantité de feuilles recommandée pour la préparation en tisane est de 5 à 7 grammes de feuilles pour un litre d'eau bouillante (2 à 3 grosses pincées). Il faut utiliser un récipient en plastique ou mieux en verre pour faire infuser, et éviter un récipient en fer (le fer réagissant avec l'artémisine). Il faut verser l'eau bouillante sur les feuilles (ne pas poursuivre l'ébullition avec les feuilles, car cela détruit l'artémisine), remuer le mélange avec une cuiller en bois, puis laisser infuser 10 minutes, le récipient étant recouvert. Puis il faut filtrer la tisane (par exemple dans un tissu pour éviter le contact avec une passoire en fer), presser les feuilles pour récupérer les reliquats d'artémisine dissoute, et enfin laisser refroidir la tisane.

2) La posologie de la tisane

Chez l'adulte, la posologie recommandée est de 1 litre par jour en 4 prises de 250 ml.

Chez l'enfant, la posologie est de 15 à 20 cc/kg, c'est-à-dire ½ litre en 4 prises pour un poids de 30 kg (4 fois un pot de yaourt bien rempli), ou 120 à 130 ml en 4 prises pour un poids de 7 kg (4 fois un quart de pot de yaourt).

La tolérance à l'artémisine est très bonne. On ne retrouve dans la littérature aucune publication rapportant des complications après traitement par artémisine ou dérivés ; il n'a pas été observé d'effets secondaires indésirables. La voie orale est bien sur le moyen le plus simple pour administrer la tisane. Cependant, lorsque la voie orale est impossible, comme chez des patients peu coopérants ou en cas de neuropaludisme avec coma, l'administration par voie rectale est possible. Cette possibilité a été soulignée et encouragée par l'OMS (75). L'artémisine par voie rectale a l'avantage d'éviter les complications que l'on peut observer si l'on traite l'accès palustre par injection de quinine intramusculaire (59). Plusieurs études ont confirmé l'efficacité de l'artémisine par voie rectale (8,12,25,34,35,47) : celle-ci élimine le parasite plus rapidement que les traitements classiques intramusculaires ou intraveineux par sels de quinine, et elle est plus efficace et plus sûre que la quinine parentérale, même en cas de paludisme sévère. Selon Koopmans (35) la concentration sanguine en artémisine administrée par voie rectale est plus élevée qu'après administration de la même dose par voie orale, avec un temps d'élimination du parasite d'environ 24 heures, donc plus rapide que par voie orale. Dans l'étude de Gomes qui porte sur 1167 patients (25), une dose massive unique était 5 fois plus efficace que des doses modérées répétées pour réduire la parasitémie de plus de 90% à 24 heures. A partir d'une méta-analyse de 39 publications, Karunajeewa (34) conclut à l'efficacité thérapeutique de l'artémisine par voie rectale, même si les résultats cliniques ne sont pas supérieurs à ceux des traitements conventionnels. Ainsi l'artémisine par voie rectale peut être considérée comme un traitement alternatif pouvant remplacer la quinine parentérale. Différentes présentations de suppositoires sont actuellement disponibles, à base d'artémisine extraite de l'*Artemisia annua*, ou à base de ses dérivés semi-synthétiques ;

cependant le coût peut en être prohibitif pour les familles les plus pauvres, et on peut remplacer les suppositoires par de la tisane d'*Artemisia annua*, administrée selon le même protocole que par voie orale, c'est-à-dire pour l'adulte un litre de tisane dans laquelle ont infusé 9 à 10 grammes de feuilles d'*Artemisia annua*, à répéter les jours suivants. La tisane est disponible à un coût minime ou quasi-nul ; elle peut être administrée par voie rectale sous forme de goutte-à-goutte à l'aide d'une canule rectale.

CONCLUSION

On sait actuellement que l'artémisine extraite de *l'Artémisia Annua* est efficace à près de 100%. Cependant on sait également que la production d'artémisine est insuffisante pour répondre à la demande mondiale et que par ailleurs le coût en est prohibitif pour la plupart des zones endémiques. Il existe des programmes de distribution gratuite des traitements modernes a base d'artémisine associée a des molécules à action lente (ACT), mais ces programmes contribuent a maintenir les populations ciblées en état d'assistanat... L'artémisine apportée par la tisane *d'Artémisia annua* présente l'avantage d'être très peu onéreuse et économiquement acceptable pour le traitement du paludisme, même pour les populations les plus défavorisées ; la tisane est facile à préparer et à administrer. Un avantage supplémentaire est la possibilité d'une culture locale, favorisant l'autonomisation de la population, et éliminant les incertitudes de l'acheminement et de la distribution, de même que les risques de rupture de stock. Que ce soit par voie orale ou par voie rectale, la préparation en tisane permet de traiter efficacement l'accès palustre dû au plasmodium falciparum, à condition toutefois que la durée du traitement soit suffisante. Ceci doit rester présent à l'esprit d'autant que cette indispensable durée du traitement est parfois difficile à obtenir en raison de la médiocre coopération que l'on peut rencontrer chez les patients ou leur famille. Ainsi, malgré ses insuffisances, le traitement de l'accès palustre par tisane d'*Artémisia annua* parait une alternative acceptable et recommandable.

REFERENCES

1. Agtmael (van) MA, Eggelte TA Boxtel (van) CJ. Artemisinin drugs in the treatment of malaria : from medicinal herb to registered medication. Trends Pharmacol Sci 1999 ; 20 : 199-205.
2. Akpotuzor JO, Udoh AE Etukudo MH. Total Antioxidant Status, Vitamins A, C and β -carotene Levels of Children with *P. Falciparum* Infection in University of Calabar Teaching Hospital (UCTH), Calabar. Pakistan J of Nutrition, 2007, 6 : 485-89.
3. Alin MH, Björkman A. Concentration and time dependency of artemisinin efficacy against Plasmodium falciparum in vitro. Am J Trop Med Hyg 1994 ; 50 : 771-76.
4. Alin MH, Ashton M, Kihamia CM, Mtev GJ, Björkman A. Clinical efficacy and pharmacokinetics of artemisinin monotherapy and in combination with mefloquine in patients with falciparum malaria. Br J Clin Pharmacol 1996; 41 : 587-92.
5. Alin MH, Ashton K, Kihamia CM, Mtev GJ, Björkman A. Multiple dose pharmacokinetics of oral artemisinin and comparison of its efficacy with that of oral artesunate in falciparum malaria patients. Trans R Soc Trop Med Hyg 1996, 90 : 61-5.
6. Ashley EA, Pinoges L, TuryakiraE, Dorsey G, Checchi F, Bukirwa H, van den Broek I, Zongo I, Palma Urruta PP, van Herp M, Balkan S, Taylor WR, Olliaro P, Guthmann JP. Different methodological approaches to the assessment of *in vivo* efficacy of three artemisinin-based combination antimalarial treatments for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in African children. Malaria Journal 2008, 7 ; 154.
7. Ashton M, Hai TN, Sy ND, Huong DX, Van Huong N, Niêu NT and Công LD. Artemisinin Pharmacokinetics is Time-Dependent during Repeated Oral Administration in Healthy Male Adults. Drug Metabolism and Distribution, 1998. 26 : 25-27.
8. Ashton M, Nguyen DS, Nguyen VH, Gordi T, Trinh NH, Dinh XH, Nguyen TN, Le DC. Artemisinin kinetics and dynamics during oral and rectal treatment of uncomplicated malaria. Clin Pharmacol Ther 1998; 63: 482-13.
9. Atemnkeng MA, Chimanuka B, Dejaegher B, Heyden YV, Plaizier-Vercammen J. Evaluation of Artemisia annua infusion efficacy for the treatment of malaria in Plasmodium chabaudi chabaudi infected mice. Exp Parasitol. 2009, 122:344-8.
10. Ayoola GA , Coker HAB, Adesegun SA, Adepoju-Bello AA, Obaweya K, Ezennia EC, Atangbayila TO. Phytochemical Screening and Antioxidant Activities of Some Selected Medicinal Plants Used for Malaria Therapy in Southwestern Nigeria. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, September 2008; 7: 1019-1024.
11. Barnes KI, White NJ. Population biology and antimalarial resistance: The transmission of antimalarial drug resistance in Plasmodium falciparum. Acta Trop 2005 ; 94: 230-40).
12. Birku Y, Makonnen E, Björkman A. Comparison of rectal artemisinin with intravenous quinine in the treatment of severe malaria in Ethiopia. East Afr Med J 1999; 76:154-9.
13. Blanke CH, Naisabha GB, Balema MB, Mbaruku GM, Heide L, Müller SM. Herba *Artemisia annuae* tea preparation compared to sulfadoxine-pyrimethamine in the treatment of uncomplicated falciparum malaria in adults: a randomized double-blind clinical trial. Trop Doct 2008, 38 :113-6.

14. Bottius E, Guanzirolli A, Trape JF, Rogier C, Konate L, Druilhe P. Malaria: even more chronic in nature than previously thought; evidence for subpatent parasitaemia detectable by the polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1996, 90:15-9.
15. Chiung-Sheue Chen Liu K, Yang SL, Roberts MF, Elford BC, Phillipson JD. Antimalarial activity of *Artemisia annua* flavonoids from whole plants and cell cultures. *Plant Cell Reports*, 1992, 11 ; 637-40.
16. Chougouo Kengne RD, Kouamouo J, Moyou Somo R, Penge On'Okoko A. Comparative study of the quality and efficiency of artemisinin drug based and *Artemisia annua* grown in Cameroon. 5th MIM (Multilateral Initiative on Malaria) Pan-African Malaria Conference, 2-6 Novembre 2009, Nairobi, Kenya.
17. Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyo AP, Tarning J, Lwin KM, Ariey F, Hanpithakpong W, Lee SJ, Ringwald P, Silamut K, Imwong M, Chotivanich K, Lim P, Herdman T, An SS, Yeung S, Singhasivanon P, Day NP, Lindegardh N, Socheat D, White NJ. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *Engl J Med.* 2009, 361 : 455-67.
18. Duc DD, Vries (de) PJ, Nguyen XK, Le Nguyen B, Kager PA, Boxtel (van) CJ. The pharmacokinetics of a single dose of artemisinin in healthy Vietmanese subjects. *Am J Trop Med Hyg* 1994, 51 : 785-90.
19. Eckstein-Ludwig U, Webb RJ, I. van Goethem DA, East JM, LeeAG, Kimura M, O'Neill PM, Bray PG, Ward SA, Krishna S. Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature* 2003, 424 : 957-61.
20. Elford BC, Roberts MF, Phillipson JD, Wilson RJM. Potentiation of the antimalarial activity of qinghaosu by methoxylated flavones. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987, 81 ; 434-6.
21. Ferreira JFS, Luthria DL. Drying affects Artemisinin, Dihydroartemisinic Acid, Artemisinic Acid, and the Antioxidant Capacity of *Artemisia annua* L. leaves. *J Agric Food Chem*, 2010, 58, 1691-98.
22. Ferreira JFS, Luthria DL, Sasaki T, Heyerick A. Flavonoids from *Artemisia annua* as antioxidants and their potential synergism with artemisinin against malaria and cancer. *Molecules* 2010, 15, 3135-3170.
23. Fouda. Etude clinique sur l'efficacité thérapeutique de *l'artemisia annua* sur l'accès palustre simple. communication à Yaoundé, 5 01 2010.
24. Golenser J, Waknine JH, Krugliak M, Hunt NH, Grau GE. Current perspectives on the mechanism of action of artemisinins. *Int J Parasitol* 2006, 36 : 1427-1441.
25. Gomes M, Ribeiro I, Warsame M, KarunajeewaH, Petzold M. Rectal artemisinin for malaria: a review of efficacy and safety from individual patient data in clinical studies. *BMC Infect Dis* 2008, 28: 38-9.
26. Goulart H R, Kimura E A, Peres V J, Couto A S, Aquino Duarte F A, Katzin A M. Terpenes Arrest Parasite Development and Inhibit Biosynthesis of Isoprenoids in *Plasmodium falciparum* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, July 2004, 48 : 2502-9.
27. Green J. *The Herbal Medicine-Maker's Handbook*. The Crossing Press, Berkeley, California, 2000.
28. Heide L, Artemisinin in traditional tea preparations of *Artemisia annua*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006, 100 : 802.
29. Houzé S, Munier A, Paoletti X, Kaddouri H, Ringwald P, Le Bras. Shelf Life of Predosed Plates Containing Mefloquine, Artemisinin, Dihydroartemisinin, and Artesunate as Used for In Vitro *Plasmodium falciparum* Susceptibility Assessment. *J Clin Microbiol* 2007, 45: 2734-36.

30. Hsu E. Reflections on the 'discovery' of the antimalarial qinghao. *Br J Clin Pharmacol.* 2006, 61:666-70.
31. Jansen FH. The herbal tea approach for artemisinin as a therapy for malaria? *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006, 100 : 285-6.
32. Jansen FH., Soomro, Shahid A. Chemical Instability Determines the Biological Action of the Artemisinins. *Current Med Chemistry* 2007, 14: 3243-59.
33. Kapoor R, Chaudhary V, Bhatnagar AK. Effects of arbuscular mycorrhiza and phosphorus application on artemisinin concentration in *Artemisia annua L.* *Mycorrhiza* 2007, 17 : 581-7.
34. Karunajeewa HA, Manning L, Mueller I, Ilett KF, Davis TM. Rectal administration of artemisinin derivatives for the treatment of malaria. *JAMA* 2007, 297: 2381-90.
35. Koopmans R, Ha LD, Duc DD, Dien TK, Kager PA, Khanh NX, Boxtel (van) CJ, Vries (de) PJ. The pharmacokinetics of artemisinin after administration of two different suppositories to healthy Vietnamese subjects. *Am J Trop Med Hyg* 1999, 60:244-7.
36. Krishna S, Bustamante L, Haynes R K, Staines H M. Artemisinins: their growing importance in medicine. *Trends Pharmacol Sci.* 2008 October; 29(10): 520–527.
37. Laughlin J C, Heazlewood GN, Beattie BM. Cultivation of *Artemisia annua L.* In *Artemisia.* Wright C W Ed; Taylor & Francis: New York, 2002; Vol.18, pp 159-195.
38. Le NB, Pham TY, Nguyen BN, Dang CT, Pham TL, Le DC. Efficacy and effectiveness of five days treatment of uncomplicated falciparum with artemisinin or artesunate in Vietnam. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1999, 30: 3-6.
39. Lee IS, Kim KS, Jang JM, Park Y, Kim YB, Kim BK. Phytochemical constituents from the herba of *artemisia apiacea.* *Arch Pharm Res,* 2002, 25 : 285-88.
40. Lehane AM and Saliba Kevin J. Common dietary flavonoids inhibit the growth of the intraerythrocytic malaria parasite. *BMC Research Notes* 2008, 1:26.
41. Li Y, Wu YL. How Chinese scientists discovered qinghaosu (artemisinin) and developed its derivatives? What are the future perspectives? *Med Trop (Mars).* 1998;58 (3 Suppl) : 9-12.
42. Lommen WJ, Elzinga S, Verstappen FW, Bouwmeester HJ. Artemisinin and sesquiterpene precursors in dead and green leaves of *Artemisia annua L.* *crops. Planta Med* 2007, 73 ; 1133-9.
43. Lutgen P, Michels B. Bactericidal properties of *Artemisia annua* tea and dosimetry of artemisinin in water by fluorescence under UV light. Proceedings of the International Conference “Maladies Tropicales, aspects humanitaires et économiques”, Luxembourg, June 3-4 2008. In *Revue Technique Luxembourgeoise,* 2008, 2 ; 73-78.
44. McKenna P. The modest woman who beat malaria for China. *New Scientist,* 15 November 2011.
45. Maeno Y, Toyoshima T, Fujioka H, Ito Y, Meshnick SR, Benakis A, Milhous WK, Aikawa M. Morphologic effects of artemisinin in *Plasmodium falciparum.* *Am J Trop Med Hyg.* 1993, 49 ; 485-91.
46. Manirakiza A, Njuimo SP, Le Faou A, Malvy D, Millet P. Availability of Antimalarial Drugs and Evaluation of the Attitude and Practices for the Treatment of Uncomplicated Malaria in Bangui, Central African Republic. *Journal of Tropical Medicine,* Volume 2010, Article ID 510834, 5 pages, doi:10.1155/2010/510834.
47. Mehta SR, Das S. Management of malaria: recent trends. *J Commun Dis* 2006, 38:130-8.
48. Meshnick SR. Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity *International Journal for Parasitology* 32 (2002) 1655–1660.

49. Metzger A, Mukasa G, Shankar A H., Ndeezi G, Melikian G, Semba R D. Antioxidant status and acute malaria in children in Kampala, Uganda. *Am J Trop Med Hyg* 2001, 65 : 115-19.
50. Mueller MS, Karhabomga IB, Hirt HM, Wemakor E. The potential of *Artemisia annua L.* as a locally produced remedy for malaria in the tropics: agricultural, chemical and clinical aspects. *J Ethnopharmacol* 2000, 73 : 487-93.
51. Mueller MS, Runyambo N, Wagner I, Borrmann S, Dietz K, Heide L. Randomized controlled trial of a traditional preparation of *Artemisia annua L.* (Annual Wormwood) in the treatment of malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2004, 98 : 318-21.
52. Nakase I, Lai H, Singh NP, Sasaki. T Anticancer properties of artemisinin derivatives and their targeted delivery by transferrin conjugation. *Int J Pharm.* 2008 Apr 16;354(1-2):28-33.
53. Neill US. From branch to bedside: Youyou Tu is awarded the 2011 Lasker~DeBakey Clinical Medical Research Award for discovering artemisinin as a treatment for malaria. , 2011, 3; 121 : 3768-73.
54. Newton PN, McGready R, Fernandez F, Green MD, Sunjio M, Bruneton C, Phanouvong S, Millet P, Whitty CJM, Talisuna AO, Proux S, Christophel EM, Malenga G, Singhasivanon P, Bojang K, Kaur H, Palmer K, Day NPJ, Greenwood BM, Nosten F, White NJ. Manslaughter by Fake Artesunate in Asia—Will Africa Be Next? *PLoS Med.* 2006 June; 3(6): e197.
55. Ogwang PE, Ogwal J O, Kasasa S, Ejobi F, Kabasa D, Obua C. Use of *Artemisia annua L.* Infusion for Malaria Prevention: Mode of Action and Benefits in a Ugandan Community. *British J of Pharm Research*, 2011, 1: 124-132.
56. Okell LC, Drakeley CJ, Ghani AC, Bousema T, Sutherland CJ. Reduction of transmission from malaria patients by artemisinin combination therapies: a pooled analysis of six randomized trials. *Malaria Journal* 2008, 7:125.
57. Olumnese P. WHO guidelines for the treatment of malaria, World Health Organization, Geneva 2006.
58. Omar Gueye El Hadj. (Etude clinique sur l'efficacité thérapeutique de l'*Artemisia annua* sur l'accès palustre simple (à paraître).
59. Onimus M, Brunet L, Gaudeuille A, Issa Mapouka A. Le traitement des séquelles d'injections intramusculaires de sels de quinine en milieu africain. *Med Trop* 2007 ; 67: 63-75.
60. Räh K, Taxis K, Walz G, Gleiter CH, Li SM, Heide L. Pharmacokinetic study of artemisinin after oral intake of a traditional preparation of *Artemisia annua L.* (annual wormwood). *Am J Trop Med Hyg* 2004, 70: 128-32.
61. Ridder (de) S, Kooy (van der) F, Verpoorte R. *Artemisia annua* as a self-reliant treatment for malaria in developing countries. *J Ethnopharmacol* 2008, 8 : 302-314.
62. Sen R, Bandyopadhyay S, Dutta A, Mandal G, Ganguly S, Saha P, Chatterjee M. Artemisinin triggers induction of cell-cycle arrest and apoptosis in *Leishmania donovani* promastigotes. *J Med Microbiol* 2007, 56 : 1213-8
63. Sengaloundeth S, Michael D Green MD, Fernández FM, Manolin O, Phommavong K, Insixiengmay V, Hampton CY, Nyadong L, Mildenhall DC, Hostetler D, Khounsaknalath L, Vongsack L, Phompida S, Vanisaveth V, Syhakhang L, Newton PN. A stratified random survey of the proportion of poor quality oral artesunate sold at medicine outlets in the Lao PDR – implications for therapeutic failure and drug resistance. *Malaria Journal* 2009, 8:172
64. Silachamroon U, Phumratanapapin W, Krudsood S, Treeprasertsuk S, Budsaratid V, Pornpininworakij K, Wilairatan P, Looareesuwan S. Frequency of early rising parasitaemia in falciparum malaria treated with artemisinin derivatives. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2001, 32 : 50-6.

65. Simonnet X, Gaudin M, Hausammann H, Vergeres C. Le fanage au champ d'*Artemisia annua* L.: Elever la teneur en artemisinine et abaisser les couts de production. Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hortic. 2001, 33, 263–268.
66. Su V, King D, Woodrow I, McFadden G, Gleadow R. Plasmodium Falciparum growth is arrested by monoterpenes from eucalyptus oil. Flavour Fragr J, 2008 ; 23 :315-18.
67. Swarthout TD, van den Broek IV, Kayembe G, Montgomery J, Pota H, Roper C. Artesunate + amodiaquine and artesunate + sulphadoxine-pyrimethamine for treatment of uncomplicated malaria in Democratic Republic of Congo: a clinical trial with determination of sulphadoxine and pyrimethamine-resistant haplotypes. Trop Med Int Health. 2006, 11: 1503-11.
68. Vries (de) PJ, Dien TK. Clinical pharmacology and therapeutic potential of artemisinin and its derivatives in the treatment of malaria. Drugs 1996, 52; 818-36.
69. Vries (de) PJ, Tran KD, Nguyen XK, Le Nguyen B, Pham TY, Dao DD, Boxtel (van) CJ, Kager PA. The pharmacokinetics of a single dose of artemisinin in patients with uncomplicated falciparum malaria. Am J Trop Med Hyg 1997, 56 : 503-7.
70. Walker D.J. Mechanisms of artemisinin resistance in the rodent malaria pathogen Plasmodium yoelii. Antimicrob. Agents Chemother. 2000 ; 44: 344–347.
71. White NJ, Nosten F, Looareesuwan S, Watkins WM, Marsh K, Snow RW, Kokwaro G, Ouma J, Hien TT, Molyneux ME, Taylor TE, Newbold CI, Ruebush II TK, Danis M, Greenwood BM, Anderson RM, Olliaro P. Averting a malaria disaster. Lancet 1999, 353: 1965-7.
72. Whitty CJ, Staedke SG. Artemisinin-based combination treatment for malaria in Africa: no perfect solutions. Clin Infect Diseases 2005, 41: 1087-88.
73. WHO meeting on the production of artemisinin and artemisinin-based combination therapies, 6–7 June 2005, Arusha, United Republic of Tanzania
74. World malaria report 2008. World Health Organization, Geneva 2008.
75. Use of rectal artemisinin-based suppositories in the management of severe malaria. Report of a WHO Informal Consultation, 27–28 March 2006, World Health Organization, Geneva 2007.
76. Willcox M L, Burton S, Oyweka R, Namyalo R, Challand S, Lindsey K. Evaluation and pharmacovigilance of projects promoting cultivation and local use of *Artemisia annua* for malaria. *Malaria Journal* 2011, 10:84 doi:10.1186/1475-2875-10-84.
77. Willcox M, Rasoanaivo P. Comment on: Randomized controlled trial of a traditional preparation of *Artemisia annua* L. (Annual Wormwood) in the treatment of malaria. Trans R Soc Trop Med Hyg 2004, 98 : 755-6.
78. Willcox M, Bodeker G, Bourdy G, Dhingra V, Falquet J, Ferreira JFS, Graz B, Hirt HM, Hsu E, Melillo de Magalhães P, Provendier D, Wright CW. *Artemisia annua* as a Traditional Herbal Antimalarial. In *Traditional Medicinal Plants and Malaria*. M Willcox, G Bodeker, P Rasoanaivo, pp 43-59, CRC Press, 2004.
79. Woerdenbag HJ, Pras N, Bos R, Visser JF, Hendriks H, Malingré TM. Analysis of artemisinin and related sesquiterpenoids from *artemisia annua* L. by combined gas chromatography/mass spectrometry. *Phytochemical Analysis*, 1991, 2 : 215–219.
80. Wright, C.W.; Linley, P.A.; Brun, R.; Wittlin, S.; Hsu, E. Ancient chinese methods are remarkably effective for the preparation of artemisinin-rich extracts of qing hao with potent antimalarial activity. *Molecules* 2010, 15, 804–812.
81. X. Antimalaria studies on Qinghaosu. *Chin Med J (Engl)*, 1979, 92:811-6.

82. Xie G, Schepetkin IA, Siemsen DW, Kirpotina LN, Wiley JA, Quinn MT. Fractionation and Characterization of Biologically-active Polysaccharides from *Artemisia tripartita*. *Phytochemistry*. 2008, 69: 1359–1371.

83. Youyou Tu. The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. *Nature Medicine*, 2011, 17:1217-1220.