

Réflexions autour de la culture d'*Artemisia annua* et de la production d'artémisinine

Blanc B.^{1*}, Weniger B.¹, Nicolas J.-P.²

R
é
s
u
m
é

S'il s'avère difficile de contourner la problématique liée à *Artemisia annua* dans un numéro spécial comme celui-ci, il serait par ailleurs sans doute laborieux et difficile de résumer les nombreux documents liés à cette plante antipaludéenne sous la forme d'une monographie d'usage.

Nous avons choisi de puiser quelques éléments dans notre expérience et de les regrouper ici sous forme de réflexions. Ainsi, après quelques données générales sur l'espèce et sur son principe actif majeur, nous aborderons certains aspects pratiques de sa culture, de sa récolte et de son stockage, et tenterons d'en souligner la complexité.

INTRODUCTION

Le développement du paludisme, notamment en Afrique, demeure un sujet de préoccupation majeur. L'objectif du partenariat mondial «Faire reculer le paludisme» «*Roll Back Malaria*», lancé en 1998 par la Banque mondiale, l'OMS, l'UNICEF (*United Nations Children's Fund*) et le PNUD (Programme des Nations-Unies pour le Développement), est de réduire de 50 % la mortalité et la morbidité liées à cette maladie d'ici à 2010. L'accès au traitement n'est qu'une des facettes de ce programme, qui inclut également «un accès aux informations, aux technologies et aux ressources financières requises pour combattre le paludisme». Devant l'efficacité et la très faible toxicité de l'artémisinine dans le traitement du paludisme, l'OMS lance, dès 2001, des recommandations pour son utilisation dans la lutte contre cette pathologie, par le biais de l'ACT (*Artemisinin-based combination therapy*).

Assise sur le support mythique que représentent la «Pharmacopée chinoise» et son utilisation idéologique, particulièrement en Afrique, la production d'artémisinine et sa mise en forme galénique devient alors un enjeu majeur. Ainsi, la principale zone de production d'artémisinine est et demeure la Chine, aujourd'hui encore le plus grand exportateur.

Néanmoins, l'extraction s'y faisant à partir de la cueillette de plants sauvages, les quantités d'artémisinine obtenues ne peuvent répondre à la demande grandissante de médicaments ACT. Rapidement

la filière s'est retrouvée face à une pénurie de matière première, ce qui a engendré une augmentation très importante du prix de l'artémisinine (de 250-300 à 1 000 US \$ /kg). Depuis 2006, le volume de production a considérablement augmenté, faisant revenir le prix de vente de l'artémisinine purifiée autour de 300 US \$ /kg. Cette chute rapide des prix remettant en cause la survie de nombreuses petites entreprises en train de se monter, on comprend ici l'importance de partenariats locaux solides, des entreprises locales d'extraction par exemple, qui permettent de maîtriser les coûts de production.

Le prix de revient d'une dose d'ACT (marchés publics, traitements adultes) est aujourd'hui de 2,40 US \$ (Coartem®, Novartis) ou de 1,00 US \$ (ASAQ, Sanofi-Aventis et DNDi). Un traitement classique de première ligne, chloroquine ou SP¹, coûte actuellement entre 0,2

1. sulfadoxine-pyriméthamine

Contact

1. Unité Pharmacognosie et Molécules Naturelles Bioactives, UMR 7175-LC1, Faculté de Pharmacie, BP 60024, 67401 Illkirch Cedex
2. Association Jardins du Monde
15 rue Saint-Michel, 29190 Braspart

* Correspondance : barbara.blanc@yahoo.fr

et 0,5 US \$ la dose, soit cinq à six fois moins. Les ACT restent donc encore chers, mais il est important de souligner que le traitement classique bon marché, est aujourd'hui presque totalement inefficace dans de nombreux pays africains du fait des résistances. Il reste que peu de personnes en Afrique peuvent payer cette différence de prix au niveau du traitement, et seule une production à grande échelle de l'artémisinine ou de ses dérivés pourra changer significativement cette situation.

La Chine, premier producteur d'artémisinine, la commercialise à un prix très élevé, ce qui a eu comme conséquence que certains pays aux moyens limités se soient orientés vers la mise en place de leur propre filière de production d'*Artemisia annua*. Ainsi, le Vietnam d'abord, puis l'Afrique de l'Est se sont engagés dans la production de cette molécule.

De nombreux essais de culture ont déjà été mis en chantier et l'association «Jardins du monde» a été maintes fois sollicitée sur le sujet. Cet article apporte des éléments d'information et de réflexion, sur la base de ces expériences.



Artemisia annua



Carte 1 : Zones d'endémie du paludisme



Carte 2 : Zones d'intégration des ACT dans le traitement du paludisme

BOTANIQUE

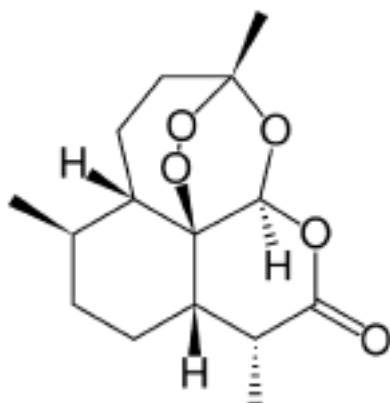
Artemisia annua L. est une plante herbacée annuelle, originaire de Chine, où elle est connue sous le nom de *qinghao*. C'est une espèce qui peut atteindre jusqu'à 2 m de hauteur. Ses rameaux et ses feuilles sont alternes, de 2,5 à 5,0 de long, elles sont glabres, segmentées, dentées et pourvues d'un appareil sécréteur aromatique. Ses fleurs, réunies en capitule, sont jaunes et de très petite taille, 2 à 3 mm de diamètre, et les capitules sont assemblés en panicules verdâtres à jaunâtres. Les ovaires sont infères et uniloculaires, chacun donnant un akène, sans pappus, d'environ 1mm de diamètre. Les trichomes glandulaires, présents dans les feuilles et les fleurs, contiennent une huile volatile.

C'est précisément dans ces trichomes que l'on retrouve l'artémisinine. La pollinisation se fait par le vent et par les insectes ce qui est rare chez les *Asteraceae*.

L'ARTÉMISININE : UN PRINCIPE ACTIF EFFICACE DE STRUCTURE PARTICULIÈRE

Formule brute : $C_{15}H_{23}O_5$

Formule développée :



L'artémisinine, une lactone sesquiterpénique comprenant un pont endopéroxyde, présente sept centres asymétriques dans sa structure, rendant ainsi sa synthèse chimique totale particulièrement laborieuse et inappropriée pour une production à grande échelle à un coût acceptable.

L'activité antimalarique de la molécule passe par l'ouverture du pont endopéroxyde et la formation de radicaux libres en présence de Fe^{++} . Pendant longtemps, on a cru que l'activité antipaludique était due au stress oxydatif engendré par les formes radicalaires, entraînant une alkylation des enzymes parasitaires, des altérations membranaires et une inhibition de la polymérisation de l'hème en hémotoïne atoxique pour le parasite. En réalité, on sait aujourd'hui que l'artémisinine ne s'accumule pas dans la vacuole digestive et que

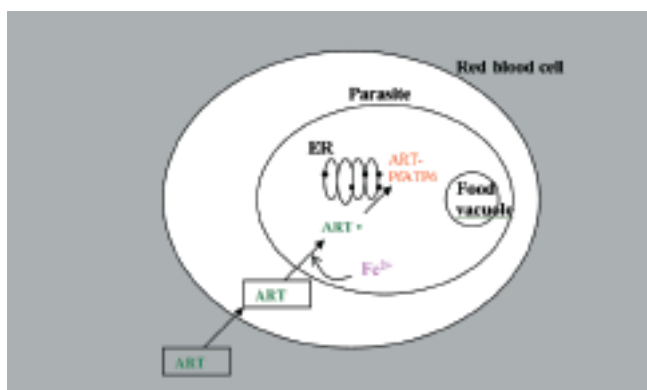


Figure 1 : Cible moléculaire de l'artémisinine au sein d'un parasite au stade trophozoïte, d'après "A new molecular target for an ancient antimalarial drug", in R.G. Ridley, 2003

son activité ne nécessite pas la présence de l'hème, mais que son impact principal se situe au niveau du réticulum endoplasmique, le mécanisme d'action consistant à inhiber d'une manière irréversible une ATPase (PfATP6) impliquée dans l'homéostasie du Ca^{++} (Eckstein-Ludwig *et al.*, 2003).

L'artémisinine présente une assez faible biodisponibilité et se révèle peu soluble dans l'eau, ce qui est un facteur défavorable en thérapeutique. Afin d'améliorer la biodisponibilité et l'efficacité du produit, l'industrie pharmaceutique a développé des dérivés semi-synthétiques, comme des éthers de la dihydro-artémisinine (artéméther et artéether) et des esters, comme l'artésunate de sodium.

Elle est utilisée aujourd'hui, tout comme ses dérivés, systématiquement en association (ACT : *Artemisinin-based combination therapy*) avec d'autres molécules actives contre le paludisme (artéméthér-luméfantrine, artésunate + amodiaquine, artésunate + sulfadoxine-pyriméthamine), pour limiter les risques de développement de résistances par le parasite.

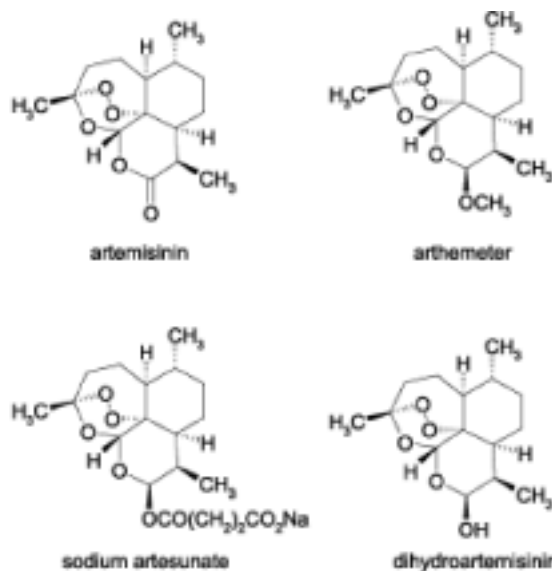


Figure 2 : Structure des composés dérivés de l'artémisinine

L'artémisinine a été détectée dans les parties aériennes de la plante, principalement dans les feuilles et inflorescences, et en quantités moindres dans la tige. Elle est absente des racines et du pollen. Elle est parfois retrouvée dans la graine, sans doute du fait de la présence de résidus floraux (Ferreira *et al.*, 1996). La quantité d'artémisinine présente dans l'espèce est très variable en fonction de nombreux facteurs, notamment de la souche génétique de la plante, de la nature du sol, de l'altitude et de la pluviométrie. Sa culture varie en fonction des habitudes culturelles des populations ainsi que des conditions géographiques et climatiques des pays concernés.

LES PROBLÉMATIQUES AGRICOLES

Artemisia annua est une plante à floraison à jour court, ce qui limite sa production en zone tropicale où sa floraison précoce entrave

Table 1 : Artemisinin content of different organs and structures of greenhouse -and field- grown *Artemisia annua*, determined by HPLC-EC (Source: Ferreira *et al.*, 1995)

Organ/ structure	Artemisinin (% DW x 1000)	
	Greenhouse	Field
Leaves	3-30	6-60
Main stems	0-3	0.4-7
Side stems	0	0.4-14
Roots	0	0
Flowers	12-42	104-264
Pollen	0	ND
Seed husks	ND	116
Seeds*	36	81

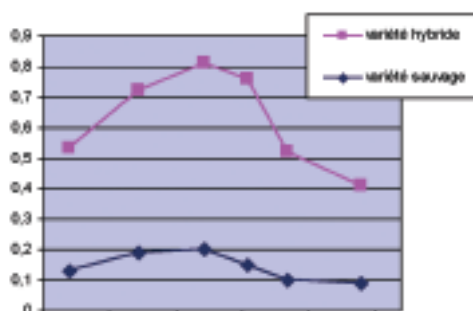
ND : Not determined / * : Containing floral debris

le développement de sa biomasse. Le contrôle de la fécondation est particulièrement difficile de part la castration des plants très délicate et la synchronisation de la floraison des différents génotypes. Par ailleurs, l'hybridation serait particulièrement instable.

Malgré toutes ces difficultés, certains organismes continuent les recherches sur le développement de plantes hybrides à haute teneur en artémisinine et les techniques culturales permettant d'améliorer les rendements. A partir de sélections variétales, la teneur en artémisinine a atteint 1,4 % et l'objectif visé est de 2 %.

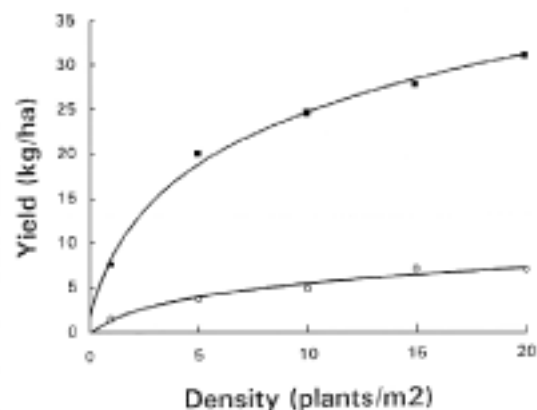
1. Quelques éléments de pratiques culturales

Les périodes de semis et de récolte sont très dépendantes du lieu de culture. En climat continental, les auteurs rapportent des dates de semis allant de la fin de l'hiver au milieu du printemps, avec des dates de récolte de fin août à début septembre. En climat tropical, on parlera de saison sèche et de saison des pluies, cette dernière étant plus propice au développement de la plante, les rendements en artémisinine y sont meilleurs [2].



Graph 1 : Dynamique de la teneur en artémisinine des feuilles sèches, d'après "Evolution, during the growing season, of artemisinin contents in the dry leaves of two lines of *Artemisia annua* grown in Switzerland" (Delabays *et al.*, 2001)

La graine est de très petite taille (10 000 à 20 000 graines/g). Il sera donc nécessaire de semer en pépinière (sous ombrières). On repiquera les jeunes plantules deux ou trois semaines après en sacs ou en pots, pour être transplantées en champ ensuite. Il ne semble pas intéressant de planter au-delà de 3 plantes/m². Le rendement en artémisinine d'une parcelle atteint rapidement un plateau avec



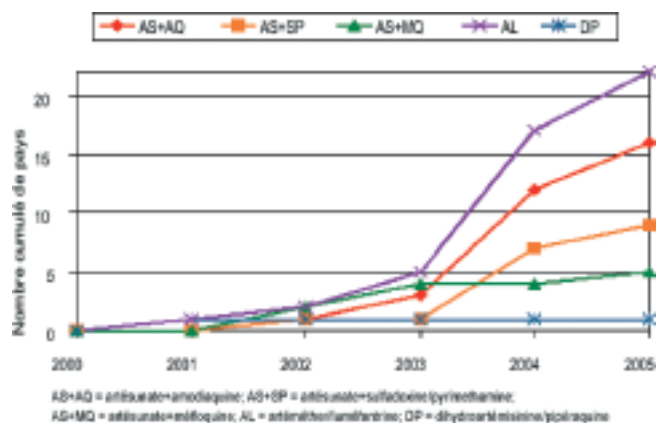
Graph 2 : Relation entre la densité de culture et le rendement en artémisinine ($n-n$) et en acide artémisinique ($m-m$) par hectare de culture

l'augmentation de densité. Les plants seront parfois étêtés de manière à s'étoffer. Leur croissance assez lente en début de culture, augmente ensuite rapidement, pour atteindre parfois les deux mètres de hauteur. Elle demande des températures tempérées chaudes et humides, un sol de pH 4,5 à 8,5, un arrosage important et soutenu. La période de culture en champs s'étale sur 5 mois.

Si certaines sources ne donnent pas de consignes particulières pour la préparation du sol, ni pour l'amendement, certaines préconisent un mélange N/P/K/ dans les proportions 60/60/50 par hectare afin d'augmenter la production végétale. D'autres signalent qu'un déficit en azote induit une chute importante de la teneur en artémisinine (Srivastava *et al.*, 1990 in Laughlin *et al.*, 2001). 70 à 80 kg d'azote par hectare semble un bon compromis entre forte production de biomasse et baisse de la biosynthèse d'artémisinine en réaction à un apport d'azote trop élevé.

La concentration en matière active augmente au cours de la saison de culture. L'artémisinine se concentre à 89 % dans les feuilles juste avant la floraison (Laughlin, 1994). La période et la densité des semis, la fumure, l'irrigation, le stade et la technique de récolte, le fanage éventuel, le séchage,... sont autant d'éléments qui interfèrent dans le taux d'artémisinine. La durée de la culture, du semis, de la transplantation, vers la cueillette se prolonge sur 6 à 7 mois, ce qui est difficilement compatible avec la courte saison des pluies de l'Afrique de l'ouest.

Les problématiques de latitude (variation et durée d'exposition à la lumière), tout comme la pluviométrie entrent également en compte. La culture d'*Artemisia annua* serait ainsi plus appropriée sur les hauts plateaux tropicaux. La spécificité de la production de la plante, nécessite une formation du personnel qui s'en occupe, en prenant



Graphique 3 : Evolution de l'adoption des ACT comme traitement de première intention dans les pays endémiques (en nombre cumulé) (Source : OMS [4])

en compte les spécificités culturelles et culturelles. Enfin, il est important de s'assurer de la traçabilité des semences.

Pour conclure, il faut noter qu'il n'existe pas de fiche technique « clé en main » pour la culture d'*Artemisia annua* en vue de la production d'artémisinine. Seuls des tests pilotes pourront permettre de connaître la réaction de la plante au milieu. Les pratiques décrites ci-dessus sont donc des pistes qui devront être adaptées en fonction de la région d'implantation.

3.2. La récolte

Le volet agricole est de loin le plus complexe. Pour pouvoir anticiper la période optimale de récolte, il est essentiel de suivre la dynamique de la teneur des feuilles en artémisinine. Elle est totalement indépendante du stade de développement de la plante, et varie selon le climat, les variétés et les conditions de culture. En effet, si la floraison apparaît comme étant souvent la période limite pour une teneur optimale des feuilles en artémisinine, cette floraison peut être totalement absente, selon la variété et la région, et ne doit donc pas constituer un point de repère obligé pour déterminer la date de récolte.

En climat continental (exemple de la Suisse, Delabays *et al*, 1994), il semble qu'une mise en place précoce (fin avril) soit judicieuse, car elle permet le meilleur rendement en feuilles sèches. Le choix d'une récolte précoce permet donc de limiter les frais de récolte, de séchage et d'extraction (moins de biomasse impliquée). La partie d'intérêt étant les feuilles sèches, l'influence du fanage au champ sur leur teneur en artémisinine a été étudiée (Simonnet *et al*, 2001). L'objectif est d'abaisser rapidement la teneur en eau des feuilles au dessous de 12 %, pour stopper les réactions biochimiques et éviter ainsi la dégradation du matériel végétal pendant le stockage.

LES PROBLÉMATIQUES DU STOCKAGE ET DE LA DISTRIBUTION

L'artémisinine n'est pas très stable, en particulier lors du stockage, où la température et l'humidité jouent un rôle important. Ainsi, une

température supérieure à 20° C et un environnement humide, fragilisent le groupe endopéroxyde de la molécule.

Même dans de bonnes conditions de stockage, le taux d'artémisinine baisse de manière régulière avec le temps. Il est donc préférable de procéder rapidement à son extraction (extrait brut), éventuellement par des unités ou des laboratoires d'extraction ambulants, et de s'assurer d'un rapide débouché sur le marché.

Lors de l'implantation de cultures d'*Artemisia annua*, chacun des maillons de la chaîne de production, depuis le semis de la plante jusqu'à la production de médicaments ACT, doit être évalué dans son contexte. Dans la plupart des cas, l'organisme qui cultive la plante se limite à l'extraction du principe actif. Mais il est important de connaître le devenir du produit et sa prise en charge par une entreprise compétente pour la fabrication et la distribution de formes thérapeutiques combinées. En effet, l'utilisation thérapeutique comme antimalarique de l'artémisinine seule ou de ses dérivés, comme elle l'était il y a quelques années, est fortement déconseillé aujourd'hui par l'OMS du fait du risque important d'émergence de résistance chez le parasite (WHO, 2006). D'autre part, maîtriser le devenir de la molécule extraite permet d'éviter de voir germer des circuits de commercialisation parallèles, qui sont un frein à une campagne de lutte contre le paludisme organisée et maîtrisée.

CONCLUSION

Il est toujours hasardeux, souvent difficile, parfois dangereux, de sortir un élément de son environnement, tant géographique que culturel, et de le transplanter dans un autre contexte. Toutefois, en matière de santé, certaines opportunités peuvent être abordées avec discernement. Les savoirs et pratiques traditionnels des populations leur permettent souvent de trouver dans leur environnement les ressources naturelles pour combattre les pathologies qui les agressent. En ce qui concerne le paludisme, ainsi que pour d'autres pathologies qui affectent les pays du sud, il nous apparaît évident de rechercher d'abord des solutions tant dans l'environnement naturel que dans les ressources culturelles des pays concernés et, dans cette situation, la démarche ethnopharmacologique est à même d'apporter sa contribution en mettant à la disposition des populations ses connaissances et ses outils scientifiques.

Cette démarche entre dans le cadre des dispositions de l'OMS visant à valoriser les pharmacopées traditionnelles, l'activité des agents de santé locaux et l'automédication des populations.

Parallèlement à cette démarche classique, des alternatives comme la culture d'*Artemisia annua* peuvent être envisagées.

La production d'artémisinine à partir d'*Artemisia annua* ne peut se faire que dans un contexte cadre qui passe par la maîtrise de toutes les étapes, de la culture, à l'extraction et à la dispensation.

Artemisia annua a fait couler beaucoup d'encre et animé bien des espoirs dans la lutte contre le paludisme. Nous espérons que les dernières étapes soient franchies rapidement afin de mettre à la disposition des patients un médicament efficace et à moindre coût.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Les références bibliographiques concernant *Artemisia annua* sont pléthores. Nous avons recueilli ici quelques-unes particulièrement en lien avec notre sujet.

Blanc B. (2007) *Rapport d'étude concernant la mise en culture d'Artemisia annua L. pour la production d'artémisinine*, Isara, Lyon.

Chun-zhao Liu, Chen Guo, Yu-chun Wang, Fan Ouyang (2002) Effect of light irradiation on hairy root growth and artemisinin biosynthesis of *Artemisia annua* L., *Process Biochemistry*, vol. 38 (4), 581-585.

Dalrymple Dana G. (2006) *Artemisia, Agriculture and Malaria in Africa: The Interplay of Tradition, Science and Public Policy*, working paper, 52 p.

De Magalhães P., Raharinaivo J., Delabays N. (1996) Influence de la dose et du type d'azote sur la production en artémisinine de l'*Artemisia annua* L., *Revue suisse Vitic. Arboric. Hortic.*, 28 (6), 349-353.

Delabays N., Simonnet X., Gaudin M. (2001) The Genetics of *Artemisia annua* L. and the Breeding of High Yielding Cultivars, *Current Medicinal Chemistry*, 8, 15, 1795-1801.

Delabays N., Jenelten U., Paris M., Pivot D., Galland N. (1994) Aspects agronomiques et génétiques de la production d'artémisinine à partir d'*Artemisia annua* L., *Revue suisse Vitic. Arboric. Hortic.*, 26 (5), 291-296.

Delabays N., Darbellay C., Galland N. Variation and heritability of artemisinin content in *Artemisia annua* L., *In* : Wright C.W.(ed), *Artemisia*, London, Ed Taylor & Francis, 197-211.

Eckstein-Ludwig *et al.* (2003) Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*, *Nature*, 424, 957 – 961.

Ferreira J.F.S., Janick J. (1996) Distribution of artemisinin in *Artemisia annua* *In*: J. Janick (ed.), *Progress in new crops*, ASHS Press, Arlington, VA, 579-584.

Laughlin J.C., Heazlewood G.N., Beattie B.M. (2002) Cultivation of *Artemisia*

annua L., *In* : Wright C.W.(ed), *Artemisia*, London, Ed Taylor & Francis, 159-195.
Ridley R.G. (2003) To kill a parasite, *Nature*, vol. 424, 887-889.

Simonnet X., Gaudin M., Hausammann H., Vergères Ch. (2001) Le fanage au champ d'*Artemisia annua* L. : élever la teneur en artémisinine et abaisser les coûts de production, *Rev. suisse Vitic. Arboric. Hortic.*, 33 (5), 263-268.

Wright C.W. (ed) (2002) *Artemisia*, London, Taylor & Francis, 344 p.

Sites Internet

[1] DNDi (Drugs for Neglected Diseases initiative), communiqué de presse, 1er Mars 2007, Une nouvelle association à doses fixes, à une prise par jour, maintenant disponible contre le paludisme
[http://www.dndi.org/pdf_files/press_release_march_1-fra.pdf]

[2] Gibrain C. (Bionexx), conférence Atelier Paludisme 2006, Institut Pasteur de Madagascar, 29 Mars 2006 ; «Artemisia annua project», présentation Power Point
[<http://www.pasteur.mg/Atelier-Palu/index.html>]

[3] MSF (Médecins Sans Frontières) ; "Les ACT : le traitement le plus efficace aujourd'hui", consulté le 21 mai 2007
[<http://www.msf.fr/site/site.nsf/pages/lesact>]

[4] OMS (Roll Back Malaria), 2006 ; "Les associations thérapeutiques à base d'artémisinine (ACT)", consulté le 24 avril 2007
[http://www.rbm.who.int/cmc_upload/0/000/015/364/RBMInfosheet_9fr.htm]

[5] OMS (Roll Back Malaria), 2006 ; "Aspects économiques du paludisme", consulté le 24 avril 2007
[http://www.rbm.who.int/cmc_upload/0/000/015/364/RBMInfosheet_10fr.htm]

[6] OMS / UNICEF (RBM), World Malaria Report 2005
[<http://www.rbm.who.int/wmr2005/html/map1.htm>]

[7] WHO monograph on good cultural and collection practices (GACP) for *Artemisia annua* L. 2006.
WHO, News Release. Calls for an immediate halt to provision of single-drug artemisinin malaria pills. 19 January 2006.
[<http://www.who.int/mediacentre/news/notes/2007/np10/fr/index.html>]