

EXTRACTION DE L'ARTÉMISININE ET SYNTHÈSE DE SES DÉRIVÉS ARTÉSUNATE ET ARTÉMÉTHER

L. CHEKEM, S. WIERUCKI

Med Trop 2006; **66** : 602-605

RÉSUMÉ • L'artémisinine, issue d'une plante chinoise, l'*Artemisia annua*, a depuis des siècles largement prouvé son efficacité dans la médecine traditionnelle en Asie. Par ailleurs, des études récentes menées dans de nombreux pays impaludés démontrent son efficacité et, parallèlement, mettent en évidence qu'aucune résistance n'a encore été rapportée comme c'est le cas pour la plupart des autres molécules présentes sur le marché. Si l'artémisinine est donc très intéressante, elle reste cependant coûteuse, ce qui restreint son accessibilité pour beaucoup de malades. Par conséquent, surmonter le défi que représente la lutte contre le paludisme implique sans plus attendre un investissement de tous les acteurs concernés en faveur d'une production massive, simple et bon marché de l'artémisinine et de ses dérivés. C'est dans cette optique que nous avons voulu développer et décrire une méthode simple et accessible à tous les professionnels pour extraire l'artémisinine, puis la transformer en artésunate ou en artéméther. L'extraction a été exécutée en utilisant du dichlorométhane, et par le jeu de différences de polarités et de la balance hydrophile/lipophile des solvants, nous avons isolé l'artémisinine pure. Ce composé a ensuite été converti en artésunate en deux étapes : premièrement, réduction de l'artémisinine en dihydroartémisinine par le DIBAL (diisobutylaluminium) et deuxièmement, estérification de la dihydroartémisinine en artésunate en présence d'anhydride succinique. Dans une autre synthèse, la dihydroartémisinine est transformée en artéméther en utilisant du trifluorure de bore. L'utilisation du dichlorométhane présente les avantages suivants : solvant non explosif, il est plus facilement manipulable et peut dès lors être transporté sur le site de culture de l'*Artemisia annua* où l'extraction peut avoir lieu. En outre, l'évaporation et la récupération de ce solvant sont plus simples. Il peut donc être réutilisé pour des extractions ultérieures sur le même site ou sur un autre, permettant ainsi de réaliser une économie importante sur l'achat de dichlorométhane et son transport. Enfin, cette méthode d'extraction permet d'éviter le transport de volumes importants de feuilles jusqu'au laboratoire (250 kg de feuilles sont nécessaires pour obtenir 4 à 5 kilos d'extract brut d'artémisinine, qui lui-même donne environ 1 kg d'artémisinine pure). Cette méthode peut donc être transposée avec une relative facilité dans n'importe quel laboratoire pharmaceutique, en particulier ceux des pays en développement.

MOTS-CLÉS • Paludisme - Artémisinine - Extraction - Dichlorométhane - DIBAL.

EXTRACTION OF ARTEMISININ AND SYNTHESIS OF ITS DERIVATES ARTESUNATE AND ARTEMETHER

ABSTRACT • Artemisinin is extracted from *Artemisia annua*, a shrub also known as sweet wormwood that was used in traditional medicine in Asia for more than 1500 years. Recent studies in numerous malarious zones have demonstrated the effectiveness of artemisinin and have reported no evidence of the resistance now associated with almost all other antimalarials on the market. Despite its remarkable activity, artemisinin is not accessible to many patients due to high cost. This situation confronts all players in the fight against malaria with the urgent need to develop a simple process to produce massive supplies of artemisinin and its derivative at an affordable price. The purpose of the study described here was to develop a simple, cost-effective method that could be used by all professionals to extract artemisinin and transform it into artesunate or artemether. Artemisinin was extracted with dichloromethane and purified on the basis of variations in polarity and in the hydrophile/lipophile balance of solvents. Transformation into artesunate was a two-step process involving reduction to dihydroartemisinin using diisobutylaluminium hydride (DIBAL) followed by esterification using succinic anhydride. Artemether was obtained from dihydroartemisinin using boron trifluoride. Extraction using dichloromethane presents several advantages. Since dichloromethane is not explosive it can be safely transported and used for extraction on farms where *Artemisia annua* is grown. Evaporation and recovery of dichloromethane is relatively easy so that it can be re-used. These advantages result in a significant decrease in purchasing and shipping costs. Extraction on the farm eliminates the expense and facilities that would otherwise be required to transport and store leaves at the laboratory (250 kg of leaves yield 4 to 5 kg of raw artemisinin extract that yields approximately 1 kg of pure artemisinin). The low-cost process described here is feasible for any pharmaceutical laboratory including those in developing countries.

KEY WORDS • Malaria – Artemisinin – Extraction – Dichloromethane – DIBAL.

Le paludisme est depuis longtemps connue comme un des soucis principaux de santé publique en Afrique subsaharienne.

- Travail du Laboratoire de recherches pharmaceutiques (L.C., S.W., Pharmaciens d'industrie), Propharex SA, Courcelles, Belgique.
- Correspondance : L. CHEKEM, laboratoire de recherches pharmaceutiques, Propharex sa, rue du Luxembourg 13, B-6180 Courcelles, Belgique • Fax : +32 71 46 96 39.
- Courriel : l.chekem@propharex.com
- Article sollicité

On estime que 300 millions à 500 millions de personnes sont atteintes tous les ans de paludisme (1) ; 90% des accès de paludisme clinique et des décès d'origine palustre se produisant dans le monde concernent l'Afrique subsaharienne. Les efforts déployés pour lutter contre le paludisme sont contrariés par l'apparition et la propagation de résistances à la plupart des molécules présentes sur le marché, avec pour conséquence une proportion importante de décès dans les pays en développement (2).

Face à l'augmentation de ces résistances, il était donc urgent de réagir à deux niveaux : (a) préconiser l'utilisation de nouvelles molécules reconnues comme efficaces, (b) mettre en évidence l'intérêt des traitements combinant plusieurs molécules afin de diminuer la probabilité que le parasite développe des résistances. C'est ce que fait aujourd'hui l'OMS quand elle recommande l'application de thérapies de combinaison contenant les dérivés de l'artémisinine (médicaments ACT : Artemisinin-based Combination Therapy) (3, 4). Elles sont à ce jour considérées comme les plus efficaces contre le paludisme.

L'artémisinine est une lactone sesquiterpénique extraite des feuilles d'un arbuste chinois appelé *Artemisia annua* (Fig. 1). L'artémisinine et ses dérivés sont employés en Chine dans un but thérapeutique depuis plus de 1 500 ans (5) et, du fait de ses propriétés thérapeutiques potentielles, la plante a été adoptée par plusieurs pays d'Europe et aux Etats-Unis (6). Suite aux recommandations de l'OMS, plusieurs pays africains se sont récemment lancés dans la culture de cette plante. Cette augmentation de l'offre d'*Artemisia annua* devrait participer à la diminution du prix du principe actif, aujourd'hui trop élevé pour permettre son utilisation massive dans les pays en développement, mais malheureusement elle ne suffira pas. En effet, les étapes ultérieures que sont l'extraction de la substance active et la fabrication du produit fini dopent également le coût final du traitement. Dans ce contexte, afin de participer à une meilleure disponibilité et accessibilité du principe actif, nous avons développé une méthode simple d'extraction de l'artémisinine et de synthèse de certains de ses dérivés, l'artésunate et l'artéméther. Cette méthode rend possible l'extraction de la majorité (98 %) de l'artémisinine contenue dans la matière végétale brute (Fig. 1).

PROTOCOLE EXPERIMENTAL (MÉTHODE)

Extraction de l'artémisinine

De la poudre de feuille et d'inflorescence d'*Artemisia annua* est mise à macérer pendant une heure dans du dichlorométhane. On filtre ensuite la solution pour séparer le fil-



Figure 1 - Feuilles d'*Artemisia annua*.



Figure 2 - Evaporation de l'extrait brut d'artémisinine dans un Rotavapor Bibby RE200.

trat du résidu de feuilles. Au résidu de feuilles on rajoute à nouveau du dichlorométhane. On laisse macérer pendant une heure et on filtre. Cette opération est répétée une troisième fois. Les filtrats obtenus sont rassemblés et évaporés pour réduire la quantité de filtrat à un petit volume facile à manipuler (Fig. 2). La solution visqueuse obtenue constitue le filtrat brut (Fig. 3, Chrom. A). Le filtrat brut est traité avec un mélange d'eau et d'acétone (8 volumes/10 volumes). La solution est filtrée à l'aide d'un filtre naturel végétal qui peut retenir tout le magma lourd. Le filtrat qui contient l'artémisinine est traité par un excès d'eau. Un précipité blanc apparaît. Cette solution est maintenue à une basse température, ce qui a pour but de accélérer la formation du précipité. La solution est filtrée et le résidu est séché. Ce résidu séché constitue l'artémisinine brute à purifier (Fig. 3, Chrom. B). La purification se fait par une extraction à contre-courant à l'hexane (Fig. 3, Chrom. C).

Synthèse de l'artésunate

Cette synthèse a été exécutée en deux étapes: (a) réduction de l'artémisinine en dihydroartémisinine et (b) estérification de la dihydroartémisinine en l'artésunate.

• Réduction de l'artémisinine

En présence de THF (tétrahydrofurane) anhydre, l'artémisinine est traitée par du DIBAL (diisobutylaluminium) ajouté progressivement. Cette réaction étant exothermique, il est préférable de la mener à basse température, autour de 0° C. Après quelques heures, du toluène est ajouté pour réaccélérer la réaction. A la fin de la réaction, une solution d'acide chlorhydrique plus de l'eau sont ajoutées. Ce rajout a pour but de stopper la réaction, de précipiter l'artémisinine et de solubiliser l'aluminium. La solution est filtrée, le résidu est dissous dans du dichlorométhane. On évapore ensuite la solution de dichlorométhane pour obtenir le résidu de dihydroartémisinine.

• Estérification

Le résidu de dihydroartémisinine obtenu ci-dessus est repris par de la pyridine. On rajoute une quantité d'anhydride

Tableau I - Détermination du nombre d'extractions à mettre en œuvre pour isoler la majorité de l'artémisinine.

TPS (minute)	Masse résidu (mg)	Masse (résidu cumulé)	%	% cumulé
60	275,8	275,8	92,09	92,09
120	19	294,8	6,34	98,43
180	2	296,8	0,67	99,10
240	2,7	299,5	0,90	100,00

succinique. La solution est maintenue sous agitation. A la fin de la réaction, de l'eau est ajoutée pour stopper la réaction et précipiter l'artésunate. La solution est filtrée et le résidu est séché. Le résidu obtenu représente l'artésunate brut qui, après purification, donnera de l'artéméthér.

Synthèse de l'artéméthér

Pour cela nous avons utilisé une partie de la dihydroartémisinine (DHA) obtenue après réduction de l'artémisinine. Nous avons privilégié l'utilisation de récipients en plastique par rapport aux récipients en verre à cause de l'effet du fluor sur le verre. Dans un récipient hermétique, la DHA est mise au contact du méthanol anhydre. On y fait barboter un gaz de trifluorure de bore. Ce gaz est obtenu en mélangeant ensemble l'acide borique, le fluorure de sodium et l'acide sulfurique. A la fin de la réaction, de l'eau est rajoutée pour faire précipiter l'artéméthér. Le résidu d'artéméthér est séché.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Extraction de l'artémisinine

Le tableau I représente la détermination du nombre d'extractions à mettre en œuvre pour isoler la majorité de l'artémisinine. Dans cet essai, nous avons laissé macérer la poudre de plante pendant quatre heures. Nous avons remplacé le liquide d'extraction une fois par heure et nous avons déterminé la quantité d'artémisinine dans chaque solution d'extraction

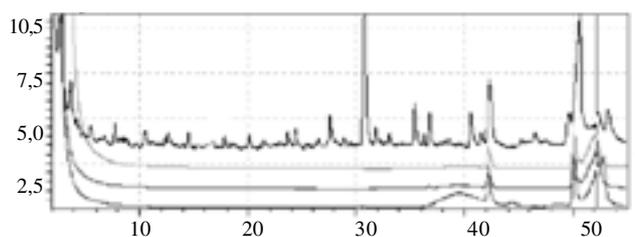


Figure 3 -Chromatogrammes GC des artémisines.

séparément. Les résultats montrent que trois extractions d'une heure chacune sont suffisantes pour extraire la majorité d'artémisinine contenue dans la plante (Tableau I).

Dans certains cas, il se peut que le résidu présente une coloration légèrement jaune, il nécessite alors une purification. Cette purification a été effectuée par une méthode à contre-courant à l'hexane. Il se peut que l'étape de purification doive être répétée plusieurs fois.

Chromatographie gazeuse

La figure 3 montre les chromatogrammes GC-MS de l'artémisinine. L'artémisinine est une substance instable à la chaleur. Elle ne peut dès lors être identifiée en chromatographie gazeuse sans être détruite. Le chromatogramme D (1^{er} à partir du bas) est celui de l'artémisinine de référence. Les chromatogrammes C, B et A sont ceux de l'échantillon à différents stades d'extraction. Le chromatogramme C (2^e à partir du bas) représente l'artémisinine purifiée, le chromatogramme B (3^e à partir du bas) celui de l'artémisinine non purifiée et enfin le chromatogramme A (4^e à partir du bas) celui de l'artémisinine provenant du filtrat brut. Sur ces chromatogrammes, on observe aussi que la désoxyginghaosu, qui est l'un des produits de la décomposition thermique de l'artémisinine, est détectée après 43 minutes. Entre 50 et 54 minutes, on observe d'autres produits issus de la décomposition de l'artémisinine. La figure 4 représente le spectre de masse de la désoxyginghaosu et la figure 5 l'identification GC-MS de l'artémisinine.

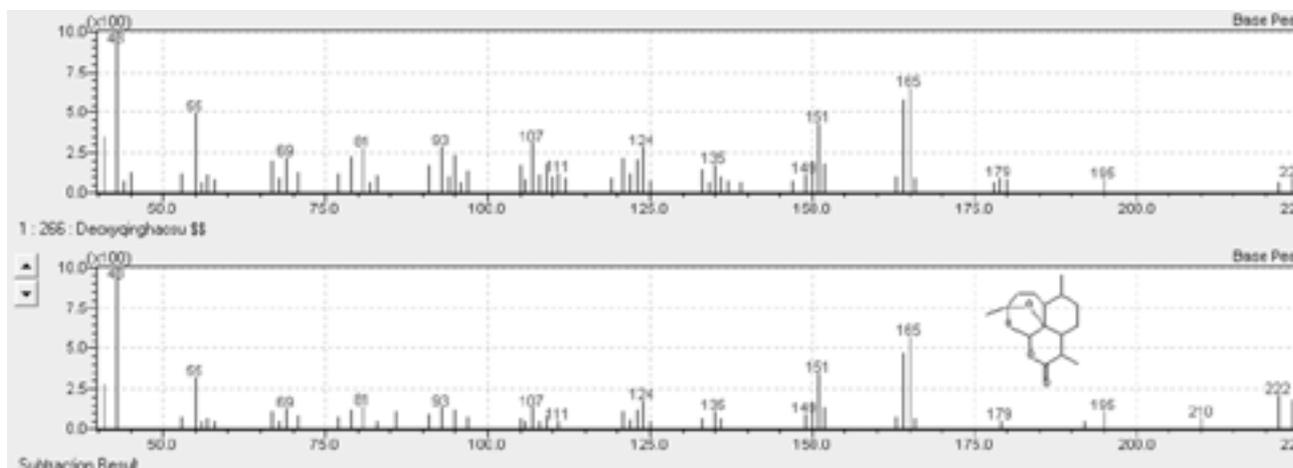


Figure 4 - Spectre de masse de la désoxyginghaosu.



Figure 5 - Identification chromatographique de l'artémisinine

La littérature rapporte plusieurs procédés d'extraction de l'artémisinine faisant intervenir des solvants différents (6, 7). Notre méthode utilise du dichlorométhane comme solvant d'extraction. Ce solvant présente certains avantages : c'est un solvant ininflammable et facilement recyclable à basse température. Comparé aux autres solvants utilisables pour l'extraction, sa concentration à saturation en artémisinine est élevée.

On pourrait donc imaginer un laboratoire ambulant d'extraction. L'étape d'extraction aurait lieu sur le site de culture de la plante et les étapes de purification et de synthèse des dérivés dans un endroit plus adapté. Ce concept permet de ramener au laboratoire uniquement l'extrait brut d'artémisinine qui représente 1/50 du poids des feuilles d'*Artemisia annua* mises en œuvre au départ.

Synthèse de l'artésunate

En ce qui concerne la réduction, la poudre d'artémisinine extraite dans la première étape est placée dans un réacteur contenant un solvant polaire anhydre. Le système est protégé de l'humidité atmosphérique. Les gaz dégagés par le système sont libérés par une soupape. Le solvant de THF est rendu anhydre par filtration sur un tamis moléculaire desséchant et à l'aide de sodium. La synthèse est maintenue à basse température car la réaction est exothermique. L'estérification, quant à elle, se fait en présence d'une base de Lewis (pyridine).

Synthèse de l'artéméther

Dans cette synthèse nous utilisons une fois de plus la poudre de dihydroartémisinine obtenue dans la première étape de la synthèse de l'artésunate. En milieu méthanolique anhydre, la réaction de la dihydroartémisinine est catalysée par le tri-fluorure de bore pour donner l'artéméther. A la fin de la réaction, de l'eau est rajoutée pour

précipiter l'artéméther. On filtre pour recueillir le précipité. Le précipité est lavé puis séché. Le tri-fluorure de bore est obtenu par la réaction entre acide borique, fluorure de sodium et acide sulfurique. La synthèse se déroule dans un récipient en plastique à cause de l'action corrosive du fluor sur le verre.

Identification des produits extraits et synthétisés

Pour identifier les produits extraits (artémisinine) ou synthétisés (artésunate, artéméther), nous avons eu recours, à côté de la GC-MS, à la chromatographie sur couche mince (CCM). Les procédures analytiques mises en œuvre au cours de ce développement sont celles décrites dans la pharmacopée internationale, troisième édition. Après un développement sur une plaque chromatographique, on pulvérise ensuite sur la plaque sèche un réactif de révélation.

CONCLUSION

Cette étude rapporte le développement d'une méthode simple d'extraction de l'artémisinine, de synthèse de l'artésunate et de l'artéméther. C'est principalement dans l'utilisation du dichlorométhane comme solvant que réside l'originalité de la méthode proposée.

Compte tenu du fait que l'artémisinine et ses dérivés représentent pour l'instant l'un des médicaments véritablement actifs contre la malaria y compris celle qui résiste à d'autres traitements, nous espérons que ce travail et sa diffusion la plus large possible inciteront à la production industrielle de l'artémisinine et de ses dérivés, spécialement dans les pays en développement. C'est dans cette optique qu'il a été mené, afin que les professionnels de santé en Afrique puissent connaître, s'appropriier et appliquer le procédé décrit ■

RÉFÉRENCES

- 1 - TOWIE N - Malaria breakthrough raises spectre of drug resistance. *Nature* 2006; **13** : 852-3.
- 2 - ELISABETH HSU - The history of qing hao in the Chinese material medica. *R Soc Trop Med Hyg* 2006; **100** : 505-8.
- 3 - LI Y - Artemisinin derivatives bearing mannich base group: synthesis and antimalarial activity *Bioorg. Med Chem* 2003; **11** : 4363-8.
- 4 - DAVIS TM, KARUNAJEEWA HA, ILETT KF - Artemisinin-based combination therapies for uncomplicated malaria. *Med J Aust* 2005; **21** : 181-5.
- 5 - TRIGG PI, WERNSDORFER WH - Malaria control priorities and constraints. *Parasitologia* 1999; **41** : 329-32.
- 6 - BALINT GA - Artemisinin and its derivatives: an important new class of antimalarial agents. *Pharmacol Ther* 2001; **90** : 261-5.
- 7 - CHRISTEN P, VEUTHEY JL - New trends in extraction, identification and quantification of artemisinin and its derivatives. *Current Medical Chemistry* 2001; **8** : 1827-39.