

## Paludisme et hémisynthèse industrielle de l'artémisinine

### Du rêve à la réalité !

**Résumé** La lutte contre le paludisme est un enjeu de santé publique au niveau mondial. L'accès à des traitements efficaces et bon marché est vital pour les populations concernées, principalement en Afrique subsaharienne, mais aussi en Asie et en Amérique latine, soit la moitié de l'humanité. Aujourd'hui, le traitement de référence est l'utilisation de combinaisons de dérivés de l'artémisinine et d'antipaludiques classiques. L'accès à l'artémisinine comme matière première en quantités et à un prix marché sous contrôle est donc clé. Cet article décrit les efforts déployés entre 2006 et 2012 pour y arriver, depuis la recherche de procédés de biologie de synthèse et de photochimie innovants jusqu'à la production d'artémisinine par Sanofi. Ces travaux ont été effectués dans le cadre d'un partenariat initié et managé par IOWH (Institut for One World Health), devenu PATH, soutenu par la Fondation Bill & Melinda Gates qui œuvre pour l'éradication du paludisme.

**Mots-clés** Artémisinine, paludisme, biologie de synthèse, photochimie.

**Abstract** **Malaria and semi-synthetic artemisinin: path to an industrial sustainable production, from dream to reality** Finding new therapies against malaria is a worldwide objective of public health. Access to effective and cheap therapies is of utmost importance for populations of Sub-Saharan Africa, Asia and Latin America, which means half of the world population. Access to artemisinin is critical as it is the main component of combination therapies for malaria which is still the best effective cure. Plant derived artemisinin is subject to shortages and price volatility. This article described the implemented efforts between 2006 and 2012 to reach this goal from innovative processes in synthetic biology and in photochemistry to industrialization and current plant production of artemisinin by Sanofi. All these efforts have been initiated and managed by IOWH, now PATH, financially sponsored by the Bill & Melinda Gates Foundation in the scope of the worldwide fight against malaria.

**Keywords** Artemisinin, malaria, synthetic biology, photochemistry.

Le paludisme est dû à des parasites de type *Plasmodium* transmis à l'homme par des piqûres de moustiques femelles *Anophèles* infectées. Le plus répandu en Afrique et le plus dangereux est le *Plasmodium falciparum*, qui est responsable de la plupart des cas mortels dans le monde. Il agit par colonisation et destruction des globules rouges. Les premiers symptômes apparaissent au bout de sept à quinze jours sous forme de fièvre, maux de têtes, frissons et vomissements. En l'absence de traitement, un paludisme sévère peut entraîner un coma et la mort chez les populations les plus vulnérables.

En 2015, près de la moitié de l'humanité était exposée au risque de contracter le paludisme, soit 3,2 milliards de personnes. Entre 2000 et 2015, l'incidence de cette maladie a reculé de 37 % à l'échelle mondiale tandis que le taux de mortalité a baissé de 48 %, principalement grâce aux traitements à base d'artémisinine.

Fin 2015, 214 millions de cas de paludisme étaient recensés à l'échelle de la planète avec plus de 400 000 morts, et ce principalement en Afrique subsaharienne : 88 % des cas et 90 % des décès. Les victimes sont le plus souvent des nourrissons, des enfants de moins de cinq ans (70 % des décès), des femmes enceintes et des personnes immunodéprimées (figure 1) [1].

Le traitement de la maladie est de plus en plus limité par l'apparition de résistance aux antipaludiques classiques comme la chloroquine, la sulfadoxine-pyriméthamine (SP) et la méfloquine.

La prévention reste le premier moyen de lutte contre les vecteurs du paludisme que sont les moustiques. L'emploi de moustiquaires imprégnées d'insecticides de type pyréthri-noïdes ainsi que le traitement des zones infectées avec des insecticides sont efficaces, mais nécessitent l'éducation et la



Figure 1 - Le paludisme, un enjeu mondial de santé publique.

En rouge : pays ou zones d'infection ; en gris foncé : pays ou zones à risque d'infection limité (source : Organisation Mondiale de la Santé, 2011). © Sanofi 2015.

distribution gratuite aux populations locales qui n'ont pas les moyens de les acheter.

### L'artémisinine, de la pharmacopée chinoise au prix Nobel 2015

L'artémisinine est un sesquiterpène ( $C_{15}H_{22}O_5$ ) de structure type lactone avec un peroxyde ponté peu courant. Il est extrait d'une plante médicinale, *Artemisia annua*, utilisée dans la médecine traditionnelle chinoise depuis plus de deux mille ans pour soigner de nombreuses infections. Dans la littérature chinoise, l'artémisinine est connue sous le nom de *qinghaosu* (青蒿素).

La molécule a été isolée et caractérisée pour la première fois en 1972 par le professeur Tu Youyou (figure 2) dans le cadre d'un programme de screening de plantes lancé par le gouvernement chinois en 1967 sous le nom « Project 523 », nom de

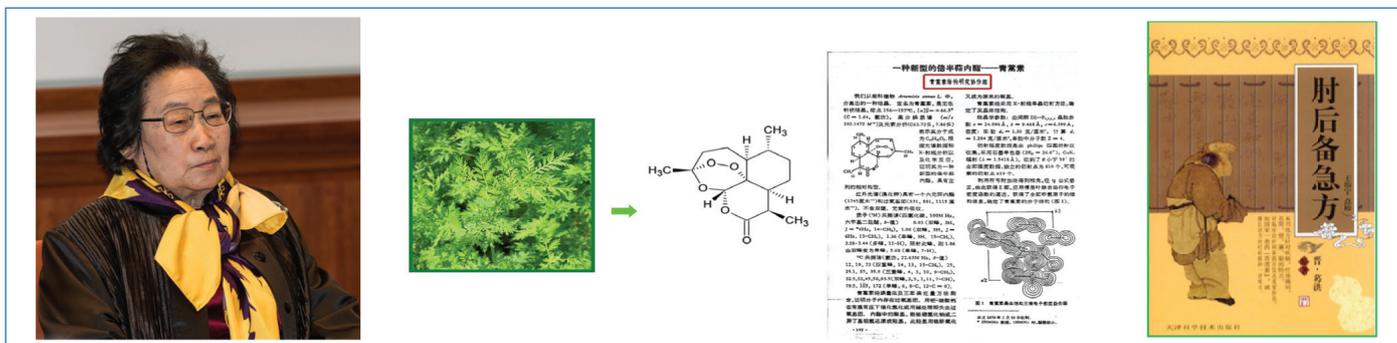


Figure 2 - Le professeur Tu Youyou, prix Nobel de physiologie ou médecine 2015 (photo : Bengt Nyman, CC BY-SA 4.0) a caractérisé l'artémisinine dans la plante *Artemisia annua* (extrait de « A new sesquiterpene lactone-qinghaosu », *Kexue Tongbao*, 1977, 22, p. 142) à partir de la pharmacopée chinoise de Ge Hong (340 apr. J.-C.).

code d'un projet militaire secret ordonné par le gouvernement de Mao Zedong pendant la guerre du Vietnam pour lutter contre le parasite du paludisme. Parmi plus de 2 000 extraits de plantes testés, l'extrait alcoolique d'*Artemisia annua* a eu un effet positif sur des souris infectées par le parasite du paludisme mais avec une efficacité très faible. En s'inspirant de la pharmacopée chinoise de Ge Hong (340 apr. J.-C.), des conditions d'extraction et d'isolement à froid de cette molécule fragile ont permis d'obtenir une efficacité *in vivo* de 100 % d'un extrait de la plante sur les souris infectées [2]. Les traitements à base de combinaisons d'artémisinine avec des antipaludiques classiques comme la luméfántrine, la pipéraquline et la pyronaridine ont alors été publiés dans le milieu des années 1970 [3]. Cette découverte a finalement été récompensée en 2015 par l'attribution du prix Nobel de physiologie ou médecine au professeur Tu Youyou « pour ses découvertes concernant un nouveau traitement contre le paludisme » [4]. L'artémisinine est une « prodrogue » dont le métabolite actif est la dihydroartémisinine, responsable de la mort du parasite présent dans les globules rouges du malade. Le mécanisme exact n'est pas connu mais serait de type oxydation radicalaire dû à la fonction peroxyde de la molécule.

À cause de la faible biodisponibilité de l'artémisinine dans les cellules, un grand nombre de dérivés plus solubles que celle-ci ont été développés comme la dihydroartémisinine, l'artéméthér et l'artésunate de sodium. Du fait de l'élimination sanguine rapide de ces dérivés, ceux-ci sont administrés en association avec des médicaments qui ont des demi-vies plus longues (méfloquine, amodiaquine, luméfántrine, pipéraquline).

Recommandées par l'Organisation mondiale de la santé (OMS), ces associations de principes actifs appelées ACT (« artemisinin combination therapy ») sont les plus efficaces aujourd'hui dans le traitement du paludisme (figure 3). Novartis a breveté le premier ACT à la fin des années 1990 avec l'artéméthér et la luméfántrine, et aujourd'hui encore des recherches sont menées pour trouver des dérivés plus efficaces ayant de meilleures solubilité et demi-vie sanguine.

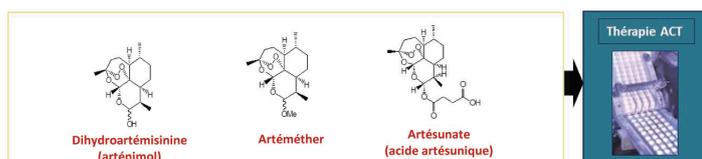


Figure 3 - Dérivés de l'artémisinine à la base des traitements ACT.

## Une problématique de santé publique

L'OMS recommande depuis 2004 ces traitements ACT à base de dérivés d'artémisinine combinés avec des antipaludiques

de demi-vie longue. Ce sont actuellement les traitements les plus efficaces et il faut éviter l'utilisation de dérivés d'artémisinine en monothérapie (uniquement pour les cas de paludisme non compliqué) afin de retarder l'apparition de résistances futures. En 2008, l'accès à ce type de traitement pour les enfants de moins de cinq ans était inférieur à 15 % en Afrique subsaharienne.

La question des quantités d'artémisinine produites mondialement et de son prix marché est donc cruciale. Les besoins estimés sont d'environ 150 tonnes/an pour pouvoir fournir les 400 millions de traitements ACT nécessaires à un coût compatible avec l'économie des pays concernés (< 1 \$/j/adulte et 0,5 \$/j/enfant) selon le rapport final de la 8<sup>th</sup> International Artemisinin Conference en 2014 [5].

Les objectifs sont de doubler la quantité produite en la stabilisant et d'éviter les fluctuations de prix selon les quantités disponibles sur le marché chaque année. La Fondation Bill & Melinda Gates s'est intéressée dès 2004 à cette problématique en lançant et finançant plusieurs projets en parallèle pour apporter une solution viable industriellement et économiquement. Elle s'est appuyée sur une étude du Boston Consulting Group pour faire une évaluation économique basée sur les quantités et les prix marché de façon à avoir un équilibre entre le maintien d'une production locale agricole et une source alternative complémentaire, tout en stabilisant le prix marché aux environs de 350-400 \$ en 2009.

## La production d'artémisinine

### Extraction végétale

*Artemisia annua* est une plante courante appelée communément *armoise annuelle* que l'on trouve dans de nombreuses régions du globe. Sa culture proprement dite prend six mois et la transformation en ACT peut prendre de deux à cinq mois selon le médicament final.

La structure chimique de type peroxyde est particulièrement sensible et les feuilles récoltées doivent être traitées rapidement et sur place pour ne pas perdre de matière active (~ 1 % d'artémisinine dans les feuilles séchées) [6]. L'OMS a publié en 2006 une monographie de bonnes pratiques de culture et de ramassage de l'armoise annuelle pour les pays pratiquant cette culture (Chine, Vietnam, Kenya, etc.) et pour aider à fiabiliser des rendements de récupération d'artémisinine très fluctuants (de 0,001 à 0,4 %) [7].

### Synthèses totales

La première synthèse totale d'artémisinine a été réalisée par des chimistes d'Hofmann La Roche en 1983 à partir d'un terpène naturel, le (-)-isopolégol [8]. Depuis, un certain nombre de synthèses totales ont été publiées dans la littérature

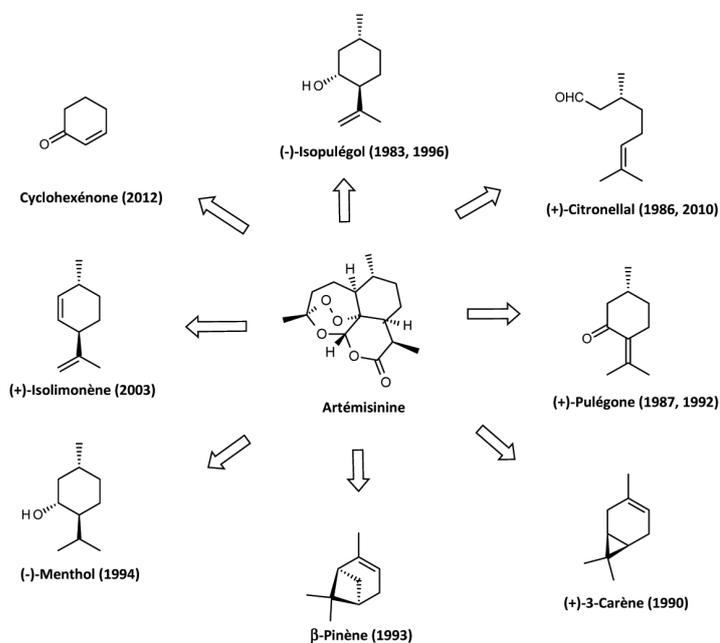


Figure 4 - Synthèses totales de l'artémisinine.

scientifique en partant d'autres terpènes disponibles commercialement et/ou avec des voies de synthèses plus courtes (figure 4) [(-)-isopulégol [9], (+)-citronellal [10-11], (+)-pulégone [12-13], (+)-3-carène [14], β-pinène [15], (-)-menthol [16], (+)-isolimonène [17]], mais aucune de ces synthèses ne peut conduire à un procédé rentable et efficace pour produire de grandes quantités de principe actif. La première revue sur ces différentes approches a été publiée dès 1994 [18].

Plus récemment, une synthèse en cinq étapes à partir d'une matière première bon marché, la cyclohexénone, a été publiée, mais elle reste encore académique [19].

## Hémisynthèses

Un procédé de préparation alternatif d'artémisinine consiste à extraire l'acide artémisinique, précurseur biosynthétique de l'*Artemisia annua*, et à le transformer chimiquement en artémisinine par plusieurs étapes de synthèse [20-21]. Comme cet acide peut être présent dans la plante à des taux environ dix fois plus élevés que l'artémisinine, la conversion de cet intermédiaire clé a reçu beaucoup d'attention. Cependant, le rendement d'extraction en acide artémisinique de l'*Artemisia annua* est très variable, et malgré la croissance rapide de la plante, on estime actuellement que l'approvisionnement mondial à partir de la plante ne permettrait pas de couvrir plus de 10 % de la demande mondiale en acide artémisinique et artémisinine.

Par une approche originale d'hémisynthèse, le précurseur biosynthétique acide artémisinique peut être produit par fermentation d'un microorganisme génétiquement modifié selon un procédé écologique et rentable pour être une source fiable

d'artémisinine de qualité. Une percée majeure a été réalisée en 2006 par l'équipe du professeur J.D. Keasling à l'Université de Berkeley et des scientifiques de la start-up Amyris qui ont mis au point un procédé de fermentation avec des levures génétiquement modifiées produisant une teneur élevée d'acide artémisinique [22-23]. Malheureusement, la transformation en artémisinine n'a pu être obtenue par cette technologie, le processus de transformation de l'acide artémisinique (probablement une photosynthèse dans la plante) n'étant pas connu. Cette approche dite par biologie de synthèse utilise un microorganisme hôte dans lequel on introduit une voie biosynthétique nouvelle. Dans ce cas, les biologistes d'Amyris ont introduit une voie mévalonique génétiquement modifiée conduisant au farnésyl-pyrophosphate, lui-même transformé en amorphadiène par une synthase ; ce dernier est oxydé par un nouveau cytochrome P450 monooxygénase d'*Artemisia annua* qui effectue en trois étapes une oxydation en l'acide artémisinique désiré (figure 5).

Toutefois, cette nouvelle voie ne permet pas d'avoir une levure génétiquement modifiée suffisamment performante pour atteindre une teneur en acide artémisinique compatible avec un projet industriel.

Les travaux de l'équipe du professeur H. Bouwmeester à Wageningen University (Pays-Bas) ont permis d'élucider la voie de la biosynthèse des précurseurs de l'artémisinine (figure 6). L'identification des différents intermédiaires a été réalisée et suit le schéma suivant : amorphadiène → alcool artémisinique (AAOH) → aldéhyde artémisinique (AAA) → aldéhyde dihydroartémisinique (DHAAA) → acide dihydroartémisinique (DHAA) [24].

C'est grâce aux travaux de l'équipe du phytochimiste canadien P.S. Covello sur l'*Artemisia annua* en 2007 [25] que les enzymes responsables des deux étapes d'oxydation entre l'alcool et l'aldéhyde et entre l'aldéhyde et l'acide ont été identifiées. Les gènes codant pour ces deux enzymes ont été ajoutés dans la dernière version de la voie biosynthétique introduite dans la levure génétiquement modifiée et ont permis à Amyris d'accéder directement à l'acide artémisinique avec des concentrations de l'ordre de 15 g/L (figure 7).

Amyris a développé un procédé de laboratoire amélioré à partir d'une levure de boulangerie (*Saccharomyces cerevisiae*) génétiquement modifiée et mise en œuvre dans des fermenteurs de laboratoire (20 L) en utilisant du glucose comme source de carbone.

## Le projet d'industrialisation

En 2007, l'Institute of One World Health (IOWH, organisation à but non lucratif, devenue PATH, Program for Appropriate Technology in Health), en charge de manager les projets soutenus et financés par la Fondation Bill & Melinda Gates, lance une offre de partenariat industriel. La candidature de Sanofi

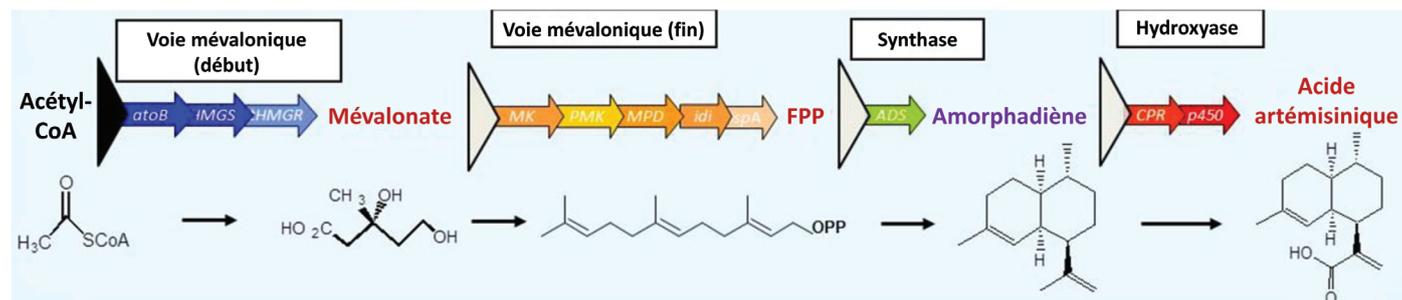


Figure 5 - Le procédé de synthèse biologique de l'acide artémisinique développé par Amyris, adapté de [23].



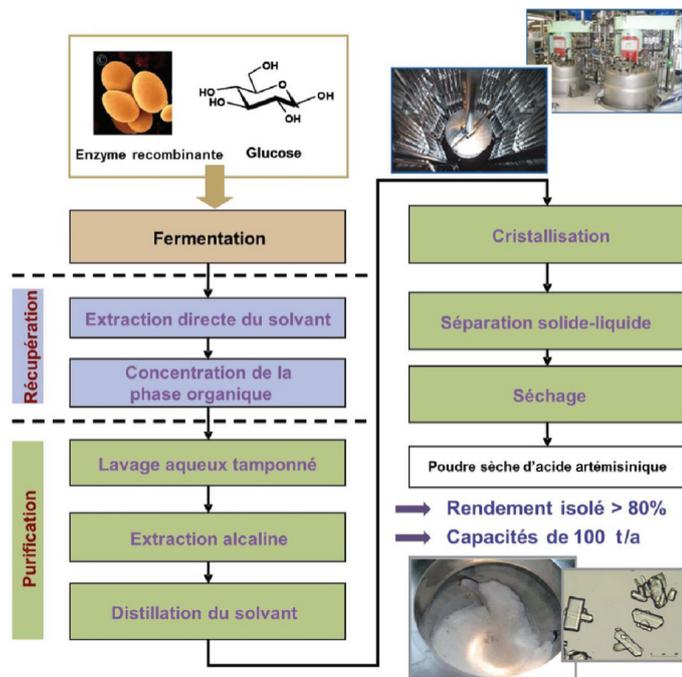


Figure 10 - Procédé industriel Sanofi de production de l'acide artémisinique par biologie de synthèse. © Sanofi.

Ce procédé de fermentation, en exploitation à l'échelle industrielle depuis 2012, permet un accès fiable et robuste à des quantités d'acide artémisinique de qualité pouvant aller jusqu'à 100 t/an. Il a été mis en œuvre avec succès dans les usines de la société Huvepharma en Bulgarie sur des fermenteurs de 60 m<sup>3</sup>.

## Le procédé chimique

### Procédé initial

La voie initiale développée par les chimistes d'Amyris (figure 11) a permis la transformation de l'acide artémisinique, isolé du procédé de fermentation, en artémisinine par un enchaînement de réactions chimiques [28]. Ce procédé consiste en :

- une réduction diastéréosélective avec le catalyseur de Wilkinson pour obtenir l'acide dihydroartémisinique de la bonne configuration majoritaire (mélange 90/10) ;
- une estérification en ester méthylique suivie d'une hydroperoxydation à l'aide d'eau oxygénée et d'un catalyseur au molybdène ;
- un réarrangement et une cyclisation en peroxyde pour obtenir la structure attendue.

Une chromatographie pour purifier l'artémisinine attendue est nécessaire afin d'avoir la même qualité que le principe actif obtenu par extraction végétale.

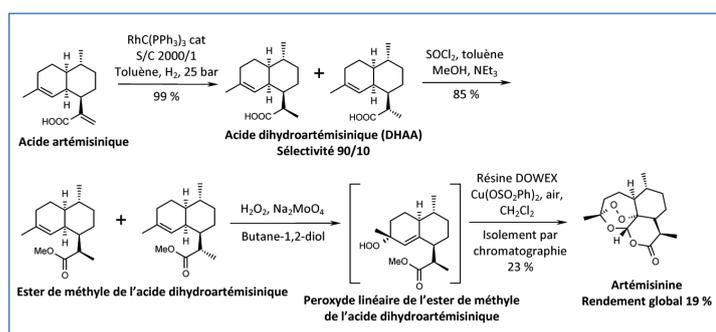


Figure 11 - Procédé initial de transformation de l'acide artémisinique développé par Amyris [28].

Les principaux inconvénients de cette voie étaient le coût du catalyseur au rhodium, les diastéréosélectivité et régiosélectivité insuffisantes, la disponibilité du catalyseur au molybdène et le coût du solvant butane-1,2-diol, et les conditions réactionnelles trop complexes du réarrangement avec un bilan chimique trop faible en artémisinine (< 40 %) nécessitant un isolement par chromatographie.

### Étape d'hydrogénation de l'acide artémisinique

L'optimisation de l'hydrogénation à l'aide du catalyseur de Wilkinson n'a pas permis d'améliorer le rapport diastéréoisomérique de façon significative. L'étude de l'hydrogénation de la double liaison exocyclique a été confiée à deux sociétés spécialisées (Johnson Matthey et Tagasako) qui ont réalisé un screening très large de catalyseurs homogènes et de conditions réactionnelles. Cette étude exhaustive a conduit à sélectionner un catalyseur de Tagasako à base de ruthénium (RuCl<sub>2</sub>[(R)-dtbm-Segphos](DMF)<sub>2</sub>) avec un rapport substrat/catalyseur de 5 000/1 sous 22 bar d'hydrogène dans le méthanol comme solvant, conduisant à une diastéréosélectivité de 95/5 et à l'absence de réduction de la double liaison endocyclique (figure 12).

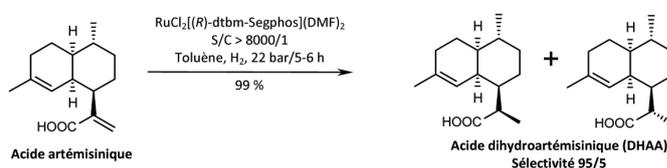


Figure 12 - Étape de réduction de l'acide artémisinique.

### Étapes ultérieures vers l'artémisinine

L'étape d'estérification ne pose pas de problème particulier si ce n'est le sens d'introduction du chlorure d'acide pour éviter la formation d'anhydride (figure 13).

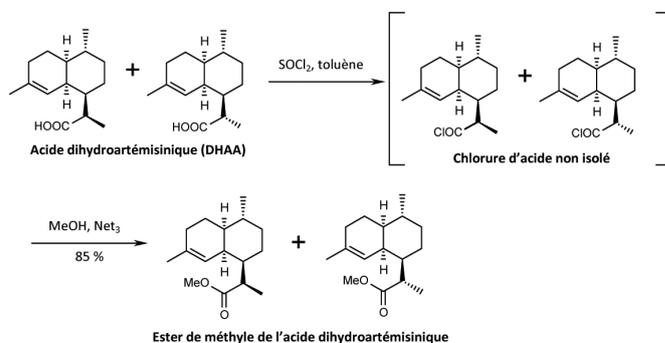


Figure 13 - Étape d'estérification de l'acide dihydroartémisinique.

La conversion de l'ester méthylique de l'acide dihydroartémisinique en hydroperoxyde correspondant a été réalisée par Amyris en utilisant les méthodes décrites par Aubry *et coll.* [29]. Les sels de molybdate catalysent la dismutation de l'eau oxygénée en eau et oxygène singulet <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. Pour des raisons de sécurité, la concentration de l'eau oxygénée a été limitée à 35 volumes et l'exothermicité contrôlée par l'addition de l'eau oxygénée au milieu (figure 14).

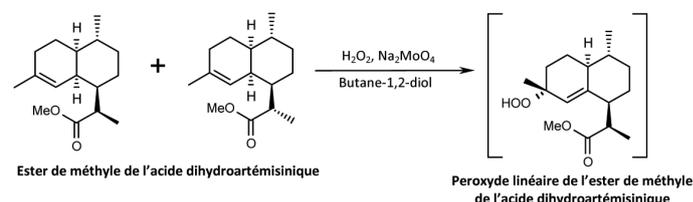


Figure 14 - Oxydation de l'ester de l'acide dihydroartémisinique en peroxyde linéaire.

Le réarrangement de Hock est bien connu à l'échelle industrielle par son application originale dans la production d'acétone à partir d'hydroperoxyde de cumène. Dans notre cas, le mécanisme proposé a été bien décrit dans la littérature [30] ; il implique la réaction de Hock sur l'intermédiaire hydroperoxyde suivi du piégeage de l'énol formé par l'oxygène triplet. Enfin, la condensation interne du nouvel hydroperoxyde intermédiaire (fonction allylique tertiaire très peu stable) conduit à un endoperoxyde par cyclisation d'un intermédiaire hémiacétal pour obtenir l'artémisinine (figure 15).

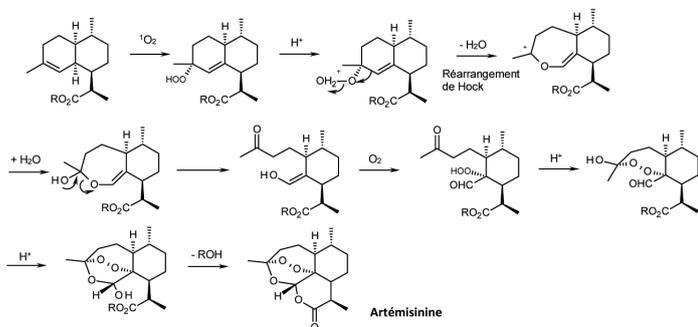


Figure 15 - Mécanisme de formation de l'artémisinine via le réarrangement de Hock.

Un effort tout particulier d'isolement chromatographique et d'analyse structurale a permis d'identifier et de caractériser les principaux sous-produits (figure 16). Les structures obtenues confirment toute la complexité de la chimie de ce réarrangement à partir de l'acide dihydroartémisinique et des impuretés formées déjà décrite par Brown [30] et qui explique les faibles rendements obtenus.

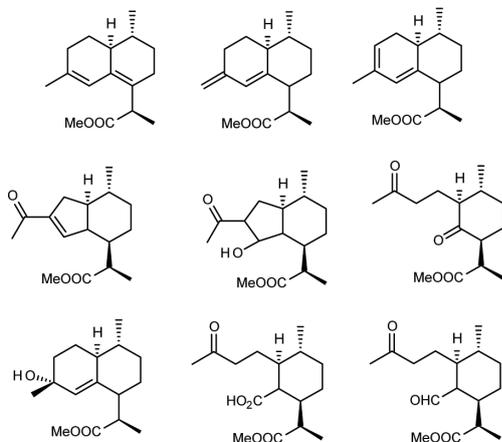


Figure 16 - Sous-produits de la synthèse de l'artémisinine isolés et caractérisés.

Début 2008, il a été clairement établi que le rendement cible de 50 % ne pourrait être atteint par l'enchaînement réactionnel proposé par Amyris malgré une optimisation exhaustive des différentes étapes de synthèse et l'isolement d'un nombre important d'impuretés pour mieux comprendre les mécanismes des deux stades d'oxydation. La stratégie de synthèse avait besoin d'être reconsidérée pour sélectionner un procédé plus efficace qui permette d'obtenir les objectifs de rendement et de coût. La réflexion conduite alors a permis de retenir les raisons principales de l'échec relatif de ce procédé :

- relative instabilité des intermédiaires dérivés de l'acide artémisinique lors des conditions d'oxydation avec l'oxygène singulet généré par  $H_2O_2/MoO_4^{2-}$  ;
- trop de sous-produits formés lors des deux étapes (réarrangement et oxydation).

Cela a également permis de proposer de nouvelles pistes de développement en évaluant d'autres activations de l'acide

artémisinique car la nature du nucléofuge influe sur la cinétique et la stabilité des intermédiaires de l'artémisinine, et en considérant un procédé de photooxydation de type continu même si celui-ci est un challenge au niveau ingénierie. Cette nouvelle stratégie a eu l'accord de l'IOWH et de la Fondation Bill & Melinda Gates sous réserve que les délais de mise sur le marché de l'artémisinine ne soient pas décalés et que le coût ciblé soit atteint.

## Le nouveau procédé

### Étape d'activation

Un large screening d'activations a été réalisé en dehors des esters et la chimie s'est révélée plus facile avec de bons rendements. Un pas décisif a été fait grâce à la découverte de nouveaux carbonates mixtes de l'acide dihydroartémisinique, se révélant étonnamment stables et de très bons substrats pour la photooxydation. Un brevet a été déposé pour protéger cette nouvelle famille de composés ainsi que leur photooxydation en artémisinine [31]. En particulier, le composé anhydride mixte d'éthyle, sélectionné comme étant l'un des meilleurs substrats pour l'étape de photooxydation, a été obtenu facilement avec un rendement quantitatif.

### Étape de photooxydation

Dans cette nouvelle stratégie, l'oxygène singulet nécessaire à la réaction est formé au moyen de l'oxygène de l'air par un transfert d'activation à l'aide d'un photosensibilisateur. Les conditions de la réaction de photooxydation ont été étudiées de façon extensive depuis la nature des photosensibilisateurs (~ 15), les longueurs d'onde et la puissance des lampes pour l'irradiation, les solvants de réaction ainsi que les catalyseurs acides utilisés. Les avantages de cette réaction photochimique sont nombreux : de l'enchaînement « one pot » des deux étapes d'hydroperoxydation et du réarrangement de Hock avec une maîtrise de la sécurité, jusqu'à l'obtention d'un bilan supérieur à 60 % en artémisinine isolée par cristallisation. Les conditions réactionnelles optimisées ont conduit à une réaction en solution de dichlorométhane avec la tétraphénylporphyrine (TPP, 0,0005 part) comme photosensibilisateur et l'acide trifluoroacétique (0,5 éq.) à - 10 °C. La principale difficulté a été d'extrapoler le procédé et de changer d'échelle en choisissant un type de réacteur photochimique compatible avec une industrialisation (60 t/an). Ainsi le procédé global de formation d'artémisinine a permis d'atteindre un rendement supérieur à 55 % à l'échelle du laboratoire (vs 41 % pour le procédé au molybdate) et avec un meilleur coût estimé (figure 17) [32].

En parallèle, un procédé de cristallisation fiable de l'artémisinine a été développé dans le *n*-heptane en prenant en compte la forte énergie de décomposition de cette molécule à basse température.

### Conception du procédé et du réacteur photochimique

De nombreux paramètres ont dû être étudiés [33] et définis pendant cette étape de montée en échelle comme :

- la sélection de la source lumineuse et sa distribution spectrale associée,
- la puissance de la lampe afin de favoriser la cinétique de formation de l'artémisinine par rapport à la dégradation des espèces en présence,
- la connaissance des spectres d'adsorption des réactifs et catalyseurs,
- la nature des matériaux et la sélection de filtres associés,

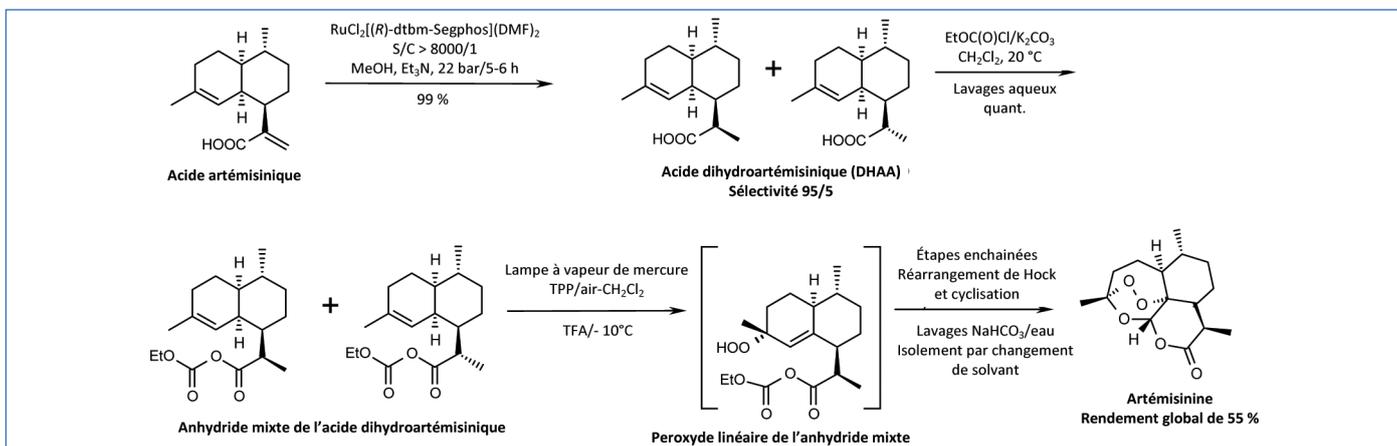


Figure 17 - Nouveau procédé Sanofi de formation de l'artémisinine à partir d'acide artémisinique.

- les paramètres physiques comme les débits ou les échanges gaz-liquides,

- les paramètres de la réaction (température, concentration).

L'objectif était de construire un réacteur photochimique minimisant la perte de lumière et optimisant le rendement photonique quantique. Parmi les alternatives évoquées avec les sociétés partenaires, UV-Consulting Peschl et De Dietrich, le choix d'un réacteur semi-continu en verre a été défini.

Divers prototypes ont été testés à l'échelle du laboratoire jusqu'à 6 L avec des lampes de 700 W confirmant les bonnes performances photochimiques mises en évidence à petite échelle. Par la suite, un prototype de taille pilote a été construit (10 kW) pour étudier des paramètres importants avant l'industrialisation comme la turbulence, le mode d'introduction de l'air, le stripage en solvant, les études de corrosion et la puissance de refroidissement de l'ensemble (figure 18).

En parallèle, le procédé de cristallisation a été optimisé et validé à échelle pilote (50 kg), aussi bien en filtre sécheur qu'en essoreuse, sur le site industriel de Neuville-sur-Saône (figure 19).

## L'industrialisation

Selon la même méthodologie, le premier ensemble de réacteurs photochimiques prémontés a été installé en 2011 sur le site de Garessio en Italie (figure 20).

La validation du procédé a été réalisée en 2012 pour atteindre des tailles de lot standard de 370 kg d'artémisinine pure isolée par cristallisation.

La qualité de l'artémisinine obtenue industriellement répond aux critères de la monographie de l'OMS qui a validé en 2013 un approvisionnement de cette source d'artémisinine par hémisynthèse.

## Et après...

L'intérêt suscité par cette molécule a fait renaître un certain nombre de travaux chez Sanofi mais aussi dans le milieu académique. Une revue récente résume notamment les travaux sur la construction du motif peroxyde de l'artémisinine de 1983 à 2016 [34]. Outre les synthèses totales déjà décrites dans cette publication, plusieurs travaux sur l'hémisynthèse à partir d'acide artémisinique peuvent être cités :

- les travaux chinois publiés en 2012 utilisant des activateurs silylés oxydés au moyen d'eau oxygénée sans catalyse [35] ;
- les travaux de Wu *et coll.* en 2013 avec la formation d'oxygène singulet au moyen de molybdates pour réaliser le réarrangement de Hock ; cette approche, déjà utilisée par Amyris,

présente des performances inférieures à l'approche photochimique [36] ;

- ceux de Lévesque et Seeberger en microréacteurs en flux continu, qui ont l'avantage d'éviter une activation de l'acide

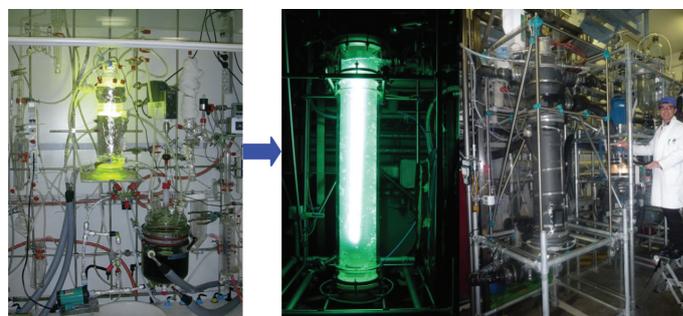


Figure 18 - Passage d'un réacteur photochimique de laboratoire de 6 L à un réacteur pilote de 50 L.



Figure 19 - Isolement de l'artémisinine en filtre sécheur (à gauche) et en essoreuse (à droite).



Figure 20 - Réacteur photochimique de taille industrielle sur le site de Garessio (Italie). Adapté avec permission de [32], © 2017 American Chemical Society.

artémisinique avant le processus de photooxydation ; ils nécessitent toujours une étape de purification de l'artémisinine formée sur gel de silice [37] ;

- la reprise des travaux d'Amyris en collaboration avec la société indienne Ipca Laboratories dans le but d'optimiser leurs conditions initiales avec le catalyseur au molybdène ; cette approche a conduit au laboratoire à des rendements similaires au procédé photochimique de Sanofi mais avec une partie de l'artémisinine isolée par chromatographie sur silice [38] ;

- l'optimisation du procédé Sanofi à plusieurs niveaux par l'utilisation de :

- diimide pour la réduction diastéréosélective de l'acide artémisinique, permettant d'améliorer la diastéréosélectivité de la réaction de réduction de l'acide artémisinique en acide dihydroartémisinique (97:3) et d'éviter l'utilisation de catalyseurs à base de métaux rares [39-40] ;

- lampes de type LED plus couteuses mais plus sélectives que les lampes à vapeur de mercure ; cette approche a notamment permis d'éviter, à l'échelle du laboratoire, l'activation au préalable de l'acide dihydroartémisinique [41] ;

- photosensibilisateurs supportés en milieu supercritique afin de développer un procédé vert plus respectueux de l'environnement ; cette approche intéressante permettant une solubilisation optimale de l'oxygène de l'air nécessaire au réarrangement de Hock n'a pas encore permis d'améliorer les performances de la réaction ni de réduire le coût de production [42].

## Conclusion

Ces résultats sont le fruit de nombreuses collaborations tant académiques qu'industrielles sous l'impulsion de l'IOWH et de la volonté de la Fondation Bill & Melinda Gates d'apporter des solutions concrètes à la lutte contre le paludisme. En effet, l'utilisation de la biologie de synthèse et de la photochimie a permis de progresser par rapport au modèle probable de biosynthèse de l'artémisinine dans la plante.

Les travaux de biologie moléculaire initiés par le professeur Keasling ont permis d'obtenir un intermédiaire avancé, l'acide artémisinique. Le développement du procédé de fermentation a été fait pour optimiser le titre en acide artémisinique, puis l'extrapolation industrielle a été réalisée par la société Huvepharma dans des fermenteurs industriels.

La transformation en artémisinine a pu être réalisée grâce à un procédé photochimique innovant *via* un intermédiaire activé pour obtenir une qualité d'artémisinine conforme aux normes de l'OMS avec un rendement de 60 %. L'extrapolation de ce procédé en mode semi-continu d'irradiation photochimique sur le site italien de Garessio a permis de produire les premières tonnes de produit pour fournir le marché dès 2012.

Ces travaux de développement et d'industrialisation ont été récompensés par plusieurs prix scientifiques dans le domaine de la chimie durable : le Prix Pierre Potier de l'Union des Industries Chimiques et de la Fondation de la Maison de la Chimie en 2012 [43], le Prix Industriel de la division Chimie organique de la Société Chimique de France en 2013 [44], et le « Patents for Humanity Award » du White House Office of Science and Technology Policy et du US Patent and Trademark Office en 2015 [45].

L'objectif de Sanofi de produire cette artémisinine semi-synthétique à prix coûtant (stratégie « no profit-no loss ») a été atteint avec un coût cible de l'ordre de 350-400 \$/kg.

Si l'équilibre visé entre production agricole par extraction et production industrielle par voie semi-synthétique n'est pas

encore atteint, la baisse du prix et de la demande en artémisinine sont néanmoins des indicateurs favorables à la santé de millions de personnes habitant les zones concernées par le paludisme [46].

Les perspectives d'évolution économiques de l'artémisinine semi-synthétique sont :

- la poursuite des travaux d'amélioration de procédés plus performants pour produire à un meilleur coût [35-42] ;

- la réduction des coûts de structure en réunissant les unités de fabrication industrielle dans une seule société (vente du site de Garessio à Huvepharma), ainsi qu'en séparant le statut de fabricant de matière première (artémisinine) pour les autres fabricants d'ACT de celui de fabricant et distributeur de son propre ACT pour Sanofi.

Enfin, dans cette lutte contre le paludisme, les efforts d'hygiène et de prévention progressent et l'arrivée d'un futur vaccin semble maintenant plus proche.

[1] *World Malaria Report*, World Health Organization, Genève, 2016.

[2] Hong G., Recipe n° 16 for treating cold and fevers of malaria, East Jin Dynasty, *Handbook of Prescriptions for Emergencies*, vol. 3, 300-400 A.D.

[3] Wang M.-Y., Publication process involving the discovery of artemisinin (qinghaosu) before 1985, *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 2016, 6, p. 461.

[4] Tu Y., Artemisinin: a gift from traditional Chinese medicine to the world (Nobel lecture), *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2016, 55, p. 2 ; voir aussi : [https://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2015/tu-facts.html](https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2015/tu-facts.html)

[5] *The report of the 8<sup>th</sup> International Artemisinin Conference*, 23-24 sept. 2014, Guangzhou, Chine.

[6] Wallaert T.E., Pras N., Beekmann A.C., Quax W.J., Seasonal variation of artemisinin and its biosynthetic precursors in plants of *Artemisia annua* of different geographical origin: proof for the existence of chemotypes, *Planta Med.*, 2000, 66, p. 57.

[7] World Health Organization, WHO monograph on good agricultural and collection practices for *Artemisia annua* L., Genève, 2006.

[8] Schmid G., Hofheinz W., Total synthesis of qinghaosu, *J. Am. Chem. Soc.*, 1983, 105, p. 624.

[9] Constantino M.G., Beltrame Jr. M., da Silva G.V.J., A novel asymmetric total synthesis of (+)-artemisinin, *Synth. Commun.*, 1996, 26, p. 321.

[10] Xu X.-X., Zhu J., Huang D.-Z., Zhou W.-S., Total synthesis of arteannuin and deoxyarteannuin, *Tetrahedron*, 1986, 42, p. 819.

[11] Yadav J.S., Thirupathiah B., Srihari P., A concise stereoselective total synthesis of (+)-artemisinin, *Tetrahedron*, 2010, 66, p. 2005.

[12] Avery M.A., Jennings-White C., Chong W.K.M., The total synthesis of (+)-artemisinin and (+)-9-desmethylartemisinin, *Tetrahedron Lett.*, 1987, 28, p. 4629.

[13] Avery M.A., Chong W.K.M., Jennings-White C., Stereoselective total synthesis of (+)-artemisinin, the antimalarial constituent of *Artemisia annua* L., *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, 114, p. 974.

[14] Ravindranathan T., Kumar M.A., Menon R.B., Hiremath S.V., Stereoselective synthesis of artemisinin, *Tetrahedron Lett.*, 1990, 31, p. 755.

[15] Liu H.J., Yeh W.L., Chew S.Y., A total synthesis of the antimalarial natural product (+)-qinghaosu, *Tetrahedron Lett.*, 1993, 34, p. 4435.

[16] Bhonsle J.B., Pandey B., Deshpande V.H., Ravindranathan T., New synthetic strategies toward (+)-artemisinin, *Tetrahedron Lett.*, 1994, 35, p. 5489.

[17] Yadav J.S., Satheesh Babu R., Sabitha G., Stereoselective total synthesis of (+)-artemisinin, *Tetrahedron Lett.*, 2003, 44, p. 387.

[18] Zhou W.-S., Xu X.-X., Total synthesis of the antimalarial sesquiterpene peroxide qinghaosu and yingzhaosu A, *Acc. Chem. Res.*, 1994, 27, p. 211.

[19] Zhu C., Cook S.P., A concise synthesis of (+)-artemisinin, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, 134, p. 13577.

[20] Acton N., Roth R.J., On the conversion of dihydroartemisinic acid into artemisinin, *J. Org. Chem.*, 1992, 57, p. 3610.

[21] Haynes R.K., Vonwiller S.C., Catalysed oxygenation of allylic hydroperoxides derived from qinghao (artemisinic) acid: conversion of qinghao acid into dehydroqinghaosu (artemisitene) and qinghaosu (artemisinin), *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1990, 6, p. 451.

[22] Ro D.-K. et al., Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast, *Nature*, 2006, 440, p. 940.

[23] Paddon C.J., Keasling J.D., Semi-synthetic artemisinin: a model for the use of synthetic biology in pharmaceutical development, *Nature Rev. Microbiol.*, 2014, 12, p. 355.

[24] Lommen W.J.M., Elzinga S., Verstappen F.W.A., Bouwmeester H.J., Artemisinin and sesquiterpene precursors in dead and green leaves of *Artemisia annua* L. crops, *Planta Med.*, 2007, 73, p. 1133.

[25] Covello P.S., Teoh K.H., Polichuk D.R., Reed D.W., Nowak G., Functional genomics and the biosynthesis of artemisinin, *Phytochemistry*, **2007**, *68*, p. 1864.  
 [26] Szczebara F.M. *et al.*, Total biosynthesis of hydrocortisone from a simple carbon source in yeast, *Nat. Biotech.*, **2003**, *21*, p. 143.  
 [27] Brion F., Colladant C., Lagouardat J., Scholl J., Procedure for preparing 1R, cis-2,2-dimethyl-3-formyl cyclopropane-1-carboxylic acid lactone and intermediates, E.P. Patent 0541445, Roussel Uclaf, **1993**.  
 [28] Paddon C.J. *et al.*, High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin, *Nature*, **2013**, *496*, p. 528.  
 [29] Alsters P.L., Jary W., Nardello-Rataj V., Aubry J.-M., "Dark" singlet oxygenation of  $\beta$ -citronellol: a key step in the manufacture of rose oxide, *Org. Process Res. Dev.*, **2010**, *14*, p. 259.  
 [30] Sy L.-K., Brown G.D., The mechanism of the spontaneous autoxidation of dihydroartemisinic acid, *Tetrahedron*, **2002**, *58*, p. 897.  
 [31] Dhainaut J., Dlubala A., Guevel R., Medard A., Oddon G., Raymond N., Turconi J., Photochemical process for producing artemisinin, US Patent 8507697 B2, Sanofi, **2011**.  
 [32] Turconi J., Griolet F., Guevel R., Oddon G., Villa R., Geatti A., Hvala M., Rossen K., Goller R., Burgard A., Semisynthetic artemisinin, the chemical path to industrial production, *Org. Process Res. Dev.*, **2014**, *18*, p. 417.  
 [33] Braun A.M., Jakob L., Oliveros E., do Nascimento C.A.O., Up-scaling photochemical reactions, in *Advances in Photochemistry*, vol. 18, Wiley, **2007**.  
 [34] Vil' V.A., Yaremenko I.A., Ilovaisky A.I., Terent'ev A.O., Synthetic strategies for peroxide ring construction in artemisinin, *Molecules*, **2017**, *22*, p. 117.  
 [35] Zhang W., Liu D., Yuan Q., Method for preparing artemisinin through arteannuic acid, Patent CN102718773A, **2012**.  
 [36] Chen H.-J., Han W.-B., Hao H.-D., Wu Y., A facile and scalable synthesis of qinghaosu (artemisinin), *Tetrahedron*, **2013**, *69*, p. 1112.  
 [37] Lévesque F., Seeberger P.H., Continuous-flow synthesis of the anti-malaria drug artemisinin, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, *51*, p. 1706.  
 [38] Singh D. *et al.*, Amalgamation of synthetic biology and chemistry for high-throughput nonconventional synthesis of the antimalarial drug artemisinin, *Org. Process Res. Dev.*, **2017**, p. 551.

[39] Castro B. *et al.*, Nonclassical CH- $\pi$  supramolecular interactions in artemisinic acid favor a single conformation, yielding high diastereoselectivity in the reduction with diazene, *J. Org. Chem.*, **2014**, *79*, p. 5939.  
 [40] Feth M.P., Rossen K., Burgard A., Pilot plant PAT approach for the diastereoselective diimide reduction of artemisinic acid, *Org. Process Res. Dev.*, **2013**, *17*, p. 282.  
 [41] Burgard A. *et al.*, Optimisation of the photochemical oxidation step in the industrial synthesis of artemisinin, *Chem. Eng. J.*, **2016**, *294*, p. 83.  
 [42] Amara Z. *et al.*, Applying green chemistry to the photochemical route to artemisinin, *Nat. Chem.*, **2015**, *7*, p. 489.  
 [43] <https://www.youtube.com/watch?v=7xh8IFHEQDw>  
 [44] [www.societechimiquedefrance.fr/Laureats-896](http://www.societechimiquedefrance.fr/Laureats-896)  
 [45] <https://youtu.be/CcpZQoqBlZg>  
 [46] Peplow M., Synthetic malaria drug meets market resistance, *Nature*, **2016**, *530*, p. 389.

**Joël TURCONI\***,  
 responsable adjoint du pilote de Développement Chimique  
 et Biotechnologique de Sanofi à Sisteron\*.  
**Philippe MACKIEWICZ**,  
 retraité de Sanofi, où il a été directeur du Développement  
 des Procédés aux Affaires Industrielles, et membre du Conseil  
 d'administration de la Société chimique de France.

\* Chemistry & Biototechnology Development, Sanofi, Bât. 205,  
 45 chemin de Mételine, F-04201 Sisteron.  
 Courriel : joel.turconi@sanofi.com

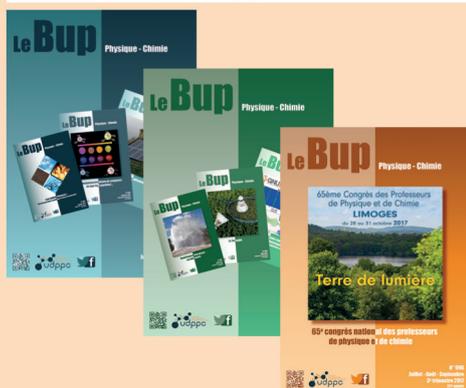


## L'Union des professeurs de physique et de chimie

Une association d'enseignants au service des enseignants

Tous les Bup de 1907 à ce jour  
 en téléchargement gratuit pour toute adhésion et abonnement

Publication numérique mensuelle  
 avec impression papier trimestrielle



Consultation du Bup en ligne  
 par articles et par numéro avec BupDoc

- ◆ Pour tous : 1907 → 2013
- ◆ Pour les abonnés : 2014 → 2018



Un congrès organisé chaque année  
 par une académie différente



Le site : <http://www.udppc.asso.fr>

Espace Labo
Textes statutaires et documents
Gestion du laboratoire...

Espace Collège
Programmes
Liens intéressants

Espace Lycée
Enquêtes
Programmes...

Documents thématiques
Autour de la classification périodique
Métrologie...

Siège social et courrier : 42 rue Saint-Jacques - 75005 PARIS  
 Tél. : 01 40 46 83 80 - Fax : 01 46 34 76 61 - [secretariat.national@udppc.asso.fr](mailto:secretariat.national@udppc.asso.fr)