

N° d'ordre : 40832

UNIVERSITE LILLE 1 – SCIENCES ET TECHNOLOGIES

ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA MATIERE, DU RAYONNEMENT ET DE
L'ENVIRONNEMENT

Doctorat

Chimie Organique et Macromoléculaire

Faustine DUBAR

AVANCÉES DANS LA COMPRÉHENSION DES MÉCANISMES
D'ACTION D'AGENTS ANTI-APICOMPLEXES :
DE LA CONCEPTION À L'IMAGERIE *IN VITRO*

Thèse dirigée par le Pr. Christophe BIOT

Soutenue le 21 septembre 2012 devant la commission d'examen

Rapporteurs

Pr. Gilles GASSER
Pr. Stéphane PICOT

Professeur des Universités, ICI, Zurich Suisse
Professeur des Universités, ICBMS, Lyon

Examineurs :

Pr Christophe BIOT
Dr. Sylvain BOHIC
Dr. Daniel DIVE
Dr Bernard MEUNIER
Dr. Anaïs MERCKX
Dr Jean-Claude MICHALSKI

Professeur des Universités, UGSF, Villeneuve d'Ascq
Chargé de Recherches, INSERM, ESRF, Grenoble
Directeur de recherches, INSERM, IPL, Lille
Directeur de Recherches, LCC, Toulouse
Maître de Conférences, UMR216 IRD, Paris
Directeur de Recherches, UGSF, Villeneuve d'Ascq

« Je n'écris plus une phrase affirmative sans être tenté d'y ajouter, « peut-être ». »

André Gide

REMERCIEMENTS

J'adresse mes plus sincères remerciements à Monsieur Jean-Claude Michalski pour m'avoir accueillie au sein de l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, et pour avoir accepté d'être le président de ce jury.

Je remercie tout particulièrement Monsieur Yann Guérardel pour m'avoir accordé sa confiance en m'accueillant dans son équipe « Diversité structurale associée aux glycoconjugués ».

Je remercie Monsieur Gilles Gasser pour avoir accepté de siéger dans ce jury et d'avoir accepté d'en être le rapporteur. De par votre expérience et vos compétences dans le domaine de la chimie organométallique, je vous remercie du regard avisé que vous porterez à ce travail.

Je remercie Monsieur Stéphane Picot pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être le rapporteur de ce travail, vos compétences dans le domaine de la chimie médicinale, et notamment dans la lutte antipaludique, permettra d'apporter à ce travail un regard critique et averti.

Je remercie Madame Anaïs Merckx pour avoir accepté d'évaluer ce travail en siégeant dans ce jury.

Je remercie Monsieur Bernard Meunier, pour m'avoir fait l'immense honneur d'accepter d'être examinateur de cette thèse.

Je remercie Monsieur Sylvain Bohic, pour avoir accepté de siéger dans ce jury et pour avoir toujours montré un grand optimisme vis-à-vis de ce travail.

Je remercie Monsieur Daniel Dive, pour avoir accepté d'être membre invité de cette thèse. Votre détermination et votre goût de la Science a été un véritable moteur tout au long de cette thèse, j'ai été vraiment très touchée par votre gentillesse et votre simplicité.

C'est avec beaucoup d'émotion que j'adresse ma profonde reconnaissance à Monsieur Christophe Biot pour m'avoir encadré depuis le Master. Plus qu'un directeur de thèse, tu es devenu un ami et ces années de recherche à tes côtés ont été riches en rebondissements. Travailler avec toi a été un immense plaisir. Ta confiance, ton respect et tes conseils avisés auront permis l'accomplissement de ce travail. Je te remercie également pour m'avoir supporté durant tant d'années et pour ne jamais avoir perdu ton enthousiasme pour ce projet. Ce travail est aussi le tien.

Je remercie mes nombreux collaborateurs, sans qui cette thèse n'aurait pas pu avoir lieu : Madame Delphine Forge, Madame Hadidjatou Kalamou, Madame Nadia Touati, Madame Alessandra Gianoncelli, Madame Rosiane Vommaro, Monsieur René Wintjens, Monsieur Jamal Khalife, Monsieur Philippe Grellier, Monsieur Christian Slomianny, Monsieur Xavier Trivelli, Monsieur Lesli Leiserowitz, Monsieur Peter Cloetens, Monsieur Eric Buisine, Monsieur Emmanuel Curis, Monsieur Ioannis Nicolis, Monsieur Hervé Vezin, Monsieur Bruno Pradines, Monsieur Jean-François Paul, Monsieur Timothy Egan, Monsieur Frédéric Beugnet, Monsieur Philippe Lawton, Monsieur Christophe Rogier et Monsieur Jean-Charles Morin, Monsieur Philippe Delannoy, Monsieur Jean-Bernard Behr.

Merci aussi à tous mes collègues et amis du Laboratoire (et des laboratoires voisins) qui se reconnaîtront ici. Je vous remercie pour l'extraordinaire ambiance dans laquelle se travail a été réalisé et je vous adresse toute ma sympathie.

Enfin je remercie mes parents Fabienne et Philippe, mes sœurs Pauline et Adeline, mon beau-frère Gaëtan, ma grand-mère Jeanine, pour avoir eu la patience de m'écouter parler de mon travail et pour votre soutien sans faille.

J'adresse une pensée toute particulière à mes grands-parents, Jacqueline et Paul, qui m'ont accueilli durant mes études et sans qui je ne serai certainement pas là aujourd'hui.

Je dédie ma thèse à Nicolas, qui a su m'épauler tout au long de cette période riche en émotions. Je te remercie pour toute la patience et l'affection dont tu as fait preuve.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE.....	17
CHAPITRE I - Introduction bibliographique.....	4
I. Les apicomplexes.....	4
I.1. Généralités	4
I.2. Morphologie.....	4
I.3. Cycle	5
I.4. Espèces d'apicomplexes	6
I.4.1. <i>T. gondii</i>	7
I.4.2. <i>C. parvum</i>	8
II . <i>Plasmodium</i>	10
II.1. Le paludisme.....	10
II.1.1. Généralités	10
II.1.2. Le parasite du paludisme : <i>Plasmodium</i>	10
II.1.3. Vecteurs du paludisme : l'anophèle femelle.....	11
II.1.3.1. Cycle biologique de l'anophèle femelle	12
II.1.3.1.1. Stade œuf	12
II.1.3.1.2. Stade larvaire	13
II.1.3.1.3. Stade pupaire	13
II.1.3.1.4. Stade adulte (ou imagal)	13
II.1.4. Agents pathogènes humains du paludisme	14
II.1.4.1. Généralités	14
II.1.4.2. Cycle de vie de <i>P. falciparum</i>	15
II.1.4.2.1. Phase asexuée chez l'hôte.....	16
II.1.4.2.2. Phase sexuée chez l'anophèle femelle.....	17
II.1.5. Clinique	17
II.1.5.1. Symptômes généraux.....	17
II.1.5.2. Les formes graves de paludisme.....	18
II.1.5.2.1. Le paludisme cérébral.....	18
II.1.5.2.2. Le paludisme chez la femme enceinte	19
II.1.5.3. La lutte antipaludique	20
II.1.5.3.1. La lutte anti-vectorielle.....	20
II.1.5.3.1.1. Contrôle larvaire	20
II.1.5.3.1.2. Contrôle adulte	21

II.1.5.3.1.3. Contrôle du contact entre les Hommes et les anophèles	22
II.1.5.3.2. Diagnostics	23
II.1.5.3.3. Les traitements.....	24
II.1.5.3.3.1. Médicaments antipaludiques	24
II.1.5.3.3.2. L’OMS et les traitements actuels ⁵⁵	28
II.1.5.3.3.2.1. Les objectifs des traitements actuels	28
II.1.5.3.3.2.1.1. Paludismes non compliqués.....	28
II.1.5.3.3.2.1.2. Paludismes graves.....	28
II.1.5.3.3.2.2. Traitements du paludisme non-compliqué dû à <i>P. falciparum</i> ..	28
II.1.5.3.3.2.2.1. Traitements par combinaison, du paludisme non-compliqué dû à <i>P. falciparum</i>	29
II.1.5.3.3.2.2.2. Traitements du paludisme non-compliqué par des combinaisons avec des ACTs.....	29
II.1.5.3.3.2.3. Traitements du paludisme grave dû à <i>P. falciparum</i>	31
II.1.5.3.3.2.4. Traitements du paludisme dû à <i>P. vivax</i> , <i>P. ovale</i> et <i>P. malariae</i>	31
II.1.5.3.3.2.5. Traitements du paludisme dû à <i>P. knowlesi</i>	32
II.1.5.3.3.2.6. Suivi des traitements actuels.....	32
II.1.5.3. 4. Les médicaments en développement	32
II.1.5.3. 4.1. Les médicaments au stade préclinique	33
II.1.5.3. 4.2. Les médicaments en phase I	35
II.1.5.3.4.3. Les médicaments en phase IIa	36
II.1.5.3.3.4. Les médicaments en phase IIb et III.....	38
II.1.5.3.4.5. Les médicaments en cours d’enregistrement.....	41
II.1.5.3.4.6. Les médicaments en phase IV	41
II.1.5.3.4.7. Approches dans le développement de nouvelles molécules	42
II.1.5.3.4.8. Approches vaccinales	42
II.1.5.4. Les cibles thérapeutiques.....	43
II.1.5.4.1. La vacuole digestive	44
II.1.5.4.1.1. Généralités	44
II.1.5.4.1.2. Digestion de l’hémoglobine.....	44
II.1.5.4.1.3. Détoxification de l’hème	45
II.1.5.4.1.4. Formation de l’hémozoïne.....	46
II.1.5.4.1.5. Les amino-4-quinoléines	50
II.1.5.4.1.5.1. La chloroquine	50
II.1.5.4.1.5.1.1. Mécanisme d’action de la CQ	50
II. 1.5.4.1.5.1.1.1. Accumulation de la CQ dans la vacuole digestive.....	50
II.1.5.4.1.5.1.1.2. Inhibition de la formation et de la nucléation de l’hémozoïne..	52

II.1.5.4.1.5.1.1.3. Mécanismes de résistance	54
II.1.5.4.1.5.2. La ferroquine	61
II.1.5.4.1.5.2.1. Le ferrocène	61
II.1.5.4.1.5.2.2. Propriétés pharmacologiques et résistance	64
II.1.5.4.1.5.2.3. Chimie de la FQ.....	68
II.1.5.4.1.5.2.4. Métabolites de la FQ.....	70
II.1.5.4.1.5.2.6. Effet de la FQ sur la gamétocytogénèse et sur la transmission vectorielle.....	73
II.1.5.4.1.5.2.7. Etat de la compréhension du mécanisme d'action de la FQ au début de la thèse	73
II.1.5.4.1.5.2.7.1. Propriétés de base faible et accumulation	74
II.1.5.4.1.5.2.7.2. Inhibition de la formation de l'hémozoïne.....	75
II.1.5.4.1.5.2.7.3. Activité rédox de la FQ.....	77
II.1.5.4.1.5.2.7.4. Structures de la FQ.....	80
II.1.5.4.2. L'apicoplaste	81
II.1.5.4.2.1. Généralités	81
II.1.5.4.2.2. Origine de l'apicoplaste.....	82
II.1.5.4.2.3. Rôle vital de l'apicoplaste	84
II.1.5.4.2.4. Fonctions biologiques de l'apicoplaste chez <i>Plasmodium</i>	85
II.1.5.4.2.4.1. Biosynthèse des isoprénoïdes : Voie des DOXP.....	85
II.1.5.4.2.4.2. Biosynthèse des acides gras.....	89
II.1.5.4.2.4.3. Synthèse des centres Fer-Soufre.....	92
II.1.5.4.2.4.4. Synthèse de l'hème	92
II.1.5.4.2.4.5. Processus moléculaires	93
II.1.5.4.2.4.5.1. Réplication de l'ADN.....	93
II.1.5.4.2.4.5.2. Transcription de l'ADN en ARN.....	94
II.1.5.4.2.4.5.3. Traduction de l'ARN	95
II.1.5.4.2.4.5.4. Molécules ciblant les processus moléculaires	96
II.1.5.4.2.4.5.4.1. La ciprofloxacine	97
II.1.5.4.2.4.5.4.2. Analogues de la ciprofloxacine.....	98
CHAPITRE II - Compréhension du mécanisme d'action de la ferroquine.....	141
I. Introduction.....	142
II. Mécanisme d'action.....	142
II.1. Propriétés physico-chimiques de la FQ et de ses analogues	142

II.1.1. Préambule	142
II.1.2. Constantes de dissociation acide et lipophilie	143
II.1.3. Liaison hydrogène intramoléculaire	146
II.1.4. Propriétés rédox	152
II.1.4.1. Génération de radicaux hydroxyles	152
II.1.4.2. Comportements électrochimiques	154
II.1.4.2.1. FQ-Me	154
II.1.4.2.2. RQ et RQ-Me.....	155
II.1.4.5. Conclusion sur les propriétés rédox.....	155
III.1. Activités antipaludique, résistances et cytotoxicité.....	156
III.1.1. Activités antipaludique.....	156
III.1.2. Résistances	157
II.1.2.1. Résistances croisées.....	157
III.1.2.2. Gènes impliqués dans la résistance de <i>P. falciparum</i>	158
III.2. Cytotoxicité	160
III.3. Localisation et imagerie	161
III.3.1. Accumulation cellulaire	162
III.3.1.1. Accumulation cellulaire de la RQ, données expérimentales.....	162
III.3.2. Distribution au niveau ultrastructurale	165
III.3.3. Localisation dans la vacuole digestive	167
III.3.3.1. Souche CQ-sensible, HB3	168
III.3.3.1.1. Localisation de la RQ.....	168
III.3.3.1.2. Localisation de la FQ	170
III.3.3.1.3. Localisation de la CQ.....	171
III.3.3.2. Souche CQ-résistante, W2	172
III.3.3.2.1. Localisation de la CQ.....	172
III.3.3.2.2. Localisation de la FQ	174
III.3.3.3. Comparaisons d'accumulation entre la CQ et la FQ.....	175
III.4. Comportement rédox de la FQ	177
III.4.1. Effets ultrastructuraux	177
III.4.2. Production de radicaux HO° dans la vacuole digestive	179
III.4.2.1. Sonde ratiométrique fluorescente pour la détection des radicaux HO°	179
III.4.2.2. Détection des radicaux hydroxyles dans <i>P. falciparum</i>	183

III.5. Mécanisme d'action dans le site d'action	189
III.5.1. Association de l'hématine avec la FQ, la RQ, la FQ-Me et la RQ-Me.....	189
III.5.2. Site de liaison proposé pour la FQ sur les faces du cristal d'hémozoïne.....	191
III.6. Conclusion.....	195

CHAPITRE III - Compréhension du mécanisme d'action d'analogues de la ciprofloxacine.....

I. Introduction.....	204
II. Fluoroquinolones organiques	205
II.1. Synthèse.....	205
II.2. Etude de la stabilité des esters	207
II.2.1. Stabilité à pH physiologique.....	207
II.2.2. Stabilité en présence de sérum humain.....	208
II.3. Basicité et lipophilie	208
II.4. Activités anti-apicomplexes et cytotoxicité.....	211
II.4.1. Activités antipaludiques	211
II.4.2. Activités anti-toxoplasmiques	212
II.4.2.1. Activités <i>in vitro</i>	212
II.4.2.2. Activités <i>in vivo</i>	213
II.5. Cytotoxicité	215
II.5.1. Cytotoxicité <i>in vitro</i>	215
II.5.2. Cytotoxicité <i>in vivo</i>	215
II.6. Ultrastructure	218
II.7. Vers une validation de la cible ?.....	219
II.7.1. Etude de docking	219
II.7.1.1. Construction du modèle.....	220
II.7.1.1.1. Alignement de séquences	220

II.7.1.1.2. Modèle des ADN gyrases de <i>P. falciparum</i> et <i>T. gondii</i>	221
II.7.1.1.3. Préparation des ligands	222
II.7.1.2.Docking	223
II.7.2. Fluorescence des rayons X	224
II.7.2.1. Préambule	224
II.7.2.2. Etude de l'accumulation des fluoroquinolones	226
II.7.2.2.1. Temps d'incubation de 24h	226
II.7.2.2.1.1. Cipro-Fc.....	226
II.7.2.2.1.2. Cipro-Ad.....	227
II.7.2.2.2. Temps d'incubation de 48h	227
II.7.2.2.3. Comparaison des ratios F/C.....	228
II.7.2.2.3.1. Cipro-Fc.....	228
II.7.2.2.3.2. Cipro-Ad.....	230
II.7.2.2.3.3. Contrôle	230
II.7.3. Activités biologiques chez <i>C. parvum</i>	231
II.8. Conclusions	234
CONCLUSION GENERALE	238
CHAPITRE IV - Partie expérimentale	242
ANNEXES	288

ABREVIATIONS

2D : deux dimensions

ABA : acide abscissique

ABC : ATP binding cassette

ACT : artemisin combination therapies

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

ASAQ : artésunate / amodiaquine

ATP : Adénosine triphosphate

BHIA : β -hématine inhibitory activities

CDRI : Institut Central de recherche de médicaments indiens

CI50 : concentration inhibitrice à 50%

Cipro : ciprofloxacine

Cipro-Ad : analogue prodrogue contenant un adamantane de la ciprofloxacine

Cipro-Bz : analogue prodrogue contenant un ferrocène de la ciprofloxacine

Cipro-Et : analogue prodrogue de la ciprofloxacine

Cipro-Fc : analogue prodrogue contenant un ferrocène de la ciprofloxacine

CQ : chloroquine

DAG : diacylglycérol

DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole

DFT : density fonctionnel theory

DGDG : digalactosyldiacylglycérol

DHA : dihydroartémisinine

di-DMFQ : N-didesméthylferroquine

DMAPP : Dimethylallyl pyrophosphate

DMF : diméthylformamide

DMFQ : N-desméthylferroquine

DMPO : 5,5-Diméthyl-1-Pyrroline-N-Oxyde

DMSO : diméthylsulfoxyde

DNDi : Drugs for Neglected Diseases initiative
DOX : doxycycline
DOXP : 1-déoxy-D-xylulose 5-phosphate
DSM : Dutch State Mines
EMA : Agence Européenne des Médicaments
EN : électronégativité
EPO : érythropoïétine
ESRF : European synchrotron radiation facility
FAS : fatty acid synthase
Fc : ferrocène
FDA : food and drug administration
Fmet : formylméthionine
FP : ferriprotoporphyrine IX
FQ : ferroquine
FQ-Me : ferroquine méthylée
G6PD : glucose-6-phosphate déshydrogénase
GDH : glutathion
GPI : glycosylphosphatidylinositol
GRP : globules rouges parasités
GRP-Ru : globules rouges parasités contenant du ruthénium
GRS : globules rouges sains
GRS-Ru : globules rouges sains contenant du ruthénium
GSK : GlaxoSmithKline
GTP : guanosine triphosphate
GyrA : gyrase sous-unité A
GyrB : gyrase sous-unité B
Hb : hémoglobine
HDP : heme detoxification protein
HF : hartree-fock
HMBC : Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HO° : radical hydroxyle
HPLC : Chromatographie liquide haute performance
HRP : protéine riche en histidine

ICAM 1 : Intercellular Adhesion Molecule 1
ICP-MS : Inductively coupled plasma mass spectrometry
IgE : Immunoglobuline E
IPP : isopenténylpyrophosphate
kDa : kilodalton
keV : kilo electron volt
MAG : monoacylglycérol
MDAQ : monodéséthylamodiaquine
MDBK : Martin Darby bovine kidney
MetHb : méthémoglobine
MGDG : monogalactosyldiacylglycérol
MiaB : ARNt méthylthiotransférase
MMV : Medicines for Malaria Venture
MQ : méfloquine
NK1 : Neurokinin 1
nM : nanomolaire
NOE : Nuclear Overhauser Enhancement
NOESY : Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
OMS : organisation mondiale pour la santé
PA : acide phosphatidique
PDH : pyruvate déshydrogénase
PEM : potentiels électrostatiques moléculaires
Pfcg2 : Plasmodium falciparum candidate gene 2
Pfcrt : Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter
Pfmdr 1 : Plasmodium falciparum multi-drug resistance 1
Pfmdr 2 : Plasmodium falciparum multi-drug resistance 2
PfPgh 1 : Plasmodium falciparum P-glycoprotein homologue protein 1
PG : phosphatidylglycérol
PIB : produit intérieur brut
PNUD : Programme des Nations Unies pour le développement
PSA : aires de surfaces polaires
QN : quinine
QRDQ : Quinolone Resistance-Determining Regions

RBM : roll back malaria

RMN : résonance magnétique nucléaire

ROESY : Rotating frame Overhause Effect SpectroscopY

ROS : espèces réactives de l'oxygène

RPE : résonance paramagnétique électronique

RQ : ruthénoquine

RQ-Me : ruthénoquine méthylée

Ru : ruthénium

SDD : silicon drift detector

TAG : triacylglycérol

TEM : microscopie électronique à transmission

TEMPO : 2,2,6,6-tétraméthylpipéridinyl-1-oxyle

THF : tétrahydrofurane

TNF : facteur de nécrose tumorale

TrxSH2 : thiorédoxine

TZVP : triple zeta valence polarisation

UV : ultra-violet

VAR : ratio d'accumulation vacuolaire

μM = micromolaire

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

Les parasites apicomplexes sont la cause de nombreux cas de décès chez les êtres humains et chez les animaux. Ces parasites opportunistes sont présents partout dans le monde et peuvent infecter les mammifères mais aussi les mollusques, les crustacés... pouvant ainsi engendrer de graves problèmes économiques. Généralement, les parasites apicomplexes ont besoin de plusieurs hôtes successifs pour mener à bien leur cycle de développement.

Parmi les apicomplexes, le parasite du paludisme représente l'un des plus grand fléau de l'humanité puisqu'il concerne la moitié de la population mondiale. Chaque année, cette maladie engendre environ 216 millions de cas ainsi que 650000 morts dans le monde. L'Afrique reste le pays majoritairement touché avec 90 % des décès, notamment des enfants de moins de cinq ans. En dehors des problèmes de santé publique, le paludisme cause de graves problèmes économiques dans les zones palustres. Parmi les cinq espèces capables d'infecter l'Homme, *Plasmodium falciparum* et *P. vivax* sont les espèces les plus répandues, *P. falciparum* étant considérée comme l'espèce engendrant le plus de morts. Les moyens de lutte existants sont les médicaments antipaludiques et la lutte contre les vecteurs du parasite *Plasmodium* spp : les anophèles. Les parasites développant de plus en plus de résistances aux médicaments, la situation devient difficile dans certaines régions du globe. De plus, les recherches actuelles n'ont pas permis de développer un vaccin efficace. Il faut donc sans cesse disposer de nouvelles molécules afin de devancer l'apparition de nouvelles résistances.

Dans cette lutte contre le paludisme, la bioorganoméallique peut présenter une stratégie intéressante pour faire face à ces problèmes de résistance. Dans cette optique, la Ferroquine (FQ) a été conçue il y a une quinzaine d'année à l'Université Lille 1. Cette molécule a tout d'abord été validée sur le plan de la pharmacologie. Puis, des essais effectués au Gabon, Sénégal, Cambodge, ainsi qu'en Thaïlande et à Madagascar, ont montré la remarquable activité de la FQ sur tous les isolats de terrain. La FQ est l'un des antipaludiques les plus avancés dans son développement industriel. En effet, la société Sanofi a évalué son efficacité et sa tolérance chez le patient afin de déterminer la posologie à administrer (phase II d'essai clinique). Elle a été testée en association avec l'artésunate, qui est un dérivé de l'artémisinine, conformément aux recommandations de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). L'association de ces deux médicaments vise à limiter l'apparition de résistances du parasite.

Dans ce contexte, il est primordial de mieux comprendre le mode d'action des molécules antipaludiques efficaces, pour en concevoir de nouvelles. Une nouvelle approche d'étude du mécanisme d'action de la FQ a été envisagée pour tenter d'élucider les différents aspects que lui confère sa haute activité antipaludique. Pour ce faire, des analogues structuraux de la FQ ont été synthétisés. Les propriétés physico-chimiques de ces analogues ont été étudiés. Les modifications structurales ont été mises en relation avec la lipophilie, les constantes d'acidité et les degrés d'ionisation. D'autre part, l'importance de la liaison hydrogène intramoléculaire a été étudiée en méthylant l'atome d'azote en position 11. L'influence de l'atome de fer sur l'activité antipaludique de la FQ a ensuite été étudiée en remplaçant l'atome de fer par un atome de ruthénium. Les activités antipaludiques de ces nouvelles molécules ont été testées *in vitro* sur des clones chloroquino-sensibles et chloroquino-résistants de *P. falciparum*. Nous avons ensuite étudié l'activité de nos molécules en fonction du polymorphisme des gènes impliqués dans la résistance aux antipaludiques quinoléiques.

L'accumulation et la localisation des molécules ont été étudiées grâce à des expériences de spectrométrie de masse et d'imagerie. Des études de modélisation moléculaire ont permis d'explorer les mécanismes d'inhibition de la croissance du pigment malarique. Les propriétés rédox des différents analogues ont été comparées dans les conditions oxydantes de la vacuole digestive du parasite. La localisation d'une sonde spécifique des radicaux hydroxyyles a permis de mettre en évidence l'importance des propriétés rédox de la FQ dans son activité antipaludique.

Récemment, une double stratégie combinant la bioorganométabolique à une approche prodrogue a permis d'améliorer l'activité antipaludique de dérivés de la ciprofloxacine, un antibiotique. Nous avons tenté de comprendre l'implication du ferrocène dans l'activité de ces molécules. Dans ce but, nous avons conçu et synthétisé de nouveaux analogues organiques. Nous avons mis en relation les propriétés physicochimiques avec l'activité antipaludique et l'activité antitoxoplasmique. Des études d'imagerie, d'ultrastructure et d'activité sur le parasite *Cryptosporidium parvum*, qui ne possède pas d'apicoplaste, ont été réalisées pour essayer de valider la cible thérapeutique de ces molécules. Une étude d'activité *in vivo* a été réalisée pour démontrer les propriétés de biodisponibilité de nos analogues.

Plan du manuscrit

Ce mémoire s'organise en quatre chapitres. Le premier chapitre est consacré à une étude bibliographique permettant de situer ce travail de thèse dans la recherche anti-apicomplexe actuelle, notamment dans la recherche antipaludique. Une partie de ce chapitre permettra de montrer les données disponibles au début de cette thèse, concernant la compréhension du mécanisme d'action de la ferroquine.

La partie résultats et discussions est divisée en deux chapitres. Le chapitre deux sera dédié à l'étude du mécanisme d'action de la ferroquine. Le chapitre trois permettra d'étudier le mécanisme d'action d'analogues prodrogues de la ciprofloxacine.

Le chapitre quatre est dédié à la partie expérimentale.

Le manuscrit sera conclu par des annexes.

CHAPITRE I

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les apicomplexes

I.1. Généralités

Les parasites protozoaires du phylum des *Apicomplexa* sont responsables de nombreux cas de mortalité et de morbidité à la fois chez les êtres humains(1, 2, 3) mais également en agriculture animale(4, 5). Les apicomplexes sont des parasites opportunistes, toujours intracellulaires. La plupart des parasites apicomplexes se développent au sein d'une vacuole parasitophore(6, 7), un compartiment isolé du trafic cellulaire. Les apicomplexes prolifèrent grâce à l'invasion d'une cellule hôte dans laquelle la croissance sera suivie de la division cellulaire du parasite. La réplication du parasite va se produire jusqu'à la lyse de la cellule hôte. Lors de cette lyse, les parasites ainsi libérés ne sont pas capables de se développer dans le milieu extracellulaire, ils doivent rapidement envahir à nouveau d'autres cellules pour survivre. Ces processus forment un cycle qui va se produire de manière répétée à l'intérieur de l'hôte. Les infections dues aux apicomplexes sont accompagnées de nombreux dommages tissulaires expliqués par la répétition de ce cycle. (8)

I.2. Morphologie

La morphologie commune à tous les apicomplexes a permis de les réunir dans un même phylum. Ils présentent une forme allongée en début de cycle, appelée sporozoïte. (9, 10) Dans le sporozoïte, il existe un complexe apical réunissant différentes organelles tels que les rhoptries, les micronèmes, le conoïde et un ou plusieurs anneaux polaires. Les rhoptries et les micronèmes interviennent dans les mécanismes d'adhésion du parasite. Ils sont également impliqués dans les phénomènes de motilité du parasite et à l'établissement de la vacuole parasitophore. Le conoïde permet la pénétration du parasite dans la cellule hôte. Les anneaux polaires interviennent dans la mobilisation des conoïdes. (8)

Ce phylum comporte également d'autres caractéristiques morphologiques communes telles que la présence du noyau (typique des cellules eucaryotes), de la mitochondrie (source principale d'énergie pour les cellules eucaryotes), de l'appareil de Golgi (rôle majeur dans les mécanismes d'exocytose), un apicoplaste : seuls les parasites du genre *Cryptosporidium* (et peut être les grégarines) n'en possèdent pas.(11-13)

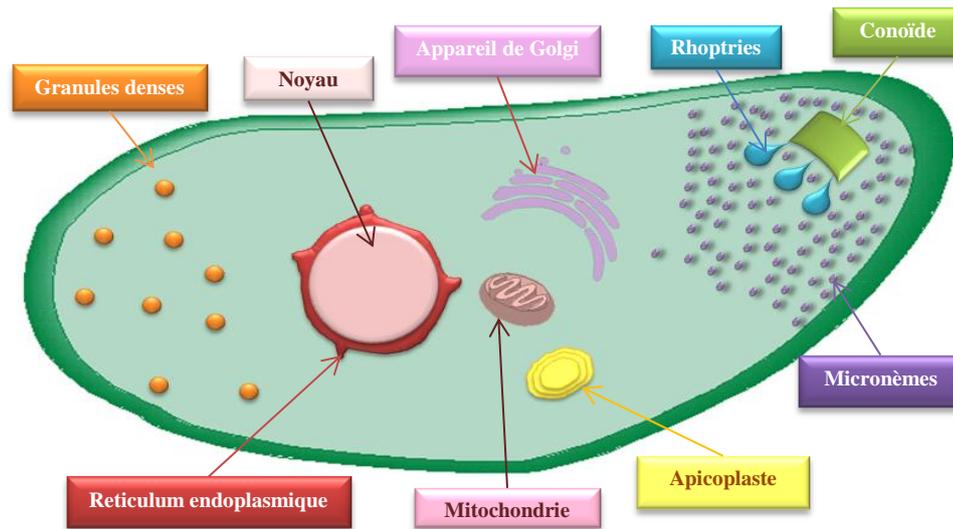


Figure 1 : Schéma général d'un parasite apicomplexe (sauf *Cryptosporidium*)

I.3. Cycle

Les apicomplexes se reproduisent sexuellement avec une alternation des formes haploïdes et diploïdes. Leur cycle de vie est complexe et implique une différenciation des formes (Figure 2) agissant dans différents tissus durant les stades du cycle.(8) Les formes haploïdes ou diploïdes peuvent subir une série de divisions rapides par mitose, appelée schizogonie. Durant la fertilisation, les gamètes mâles (microgamètes) fertiliseront des gamètes femelles (macrogamètes), qui après fusion formeront un zygote diploïde transitoire. Le zygote subit immédiatement la méiose pour rétablir des organismes haploïdes. Dans certains cas, la différenciation permet également l'infection des organismes (tels que les moustiques ou les tiques) qui servent de vecteurs à la transmission de l'infection. Selon les espèces d'apicomplexes, la différenciation passera par la formation de différentes formes intermédiaires. Par exemple, durant le cycle de *Toxoplasma gondii*(14, 15) (*T. gondii*) les sporozoïtes seront différenciés en tachyzoïtes tandis que pour *Plasmodium falciparum*(16) (*P. falciparum*), la différenciation se fera sous la forme de mérozoïte. La durée du cycle de vie des apicomplexes est dépendante du genre et de l'espèce.

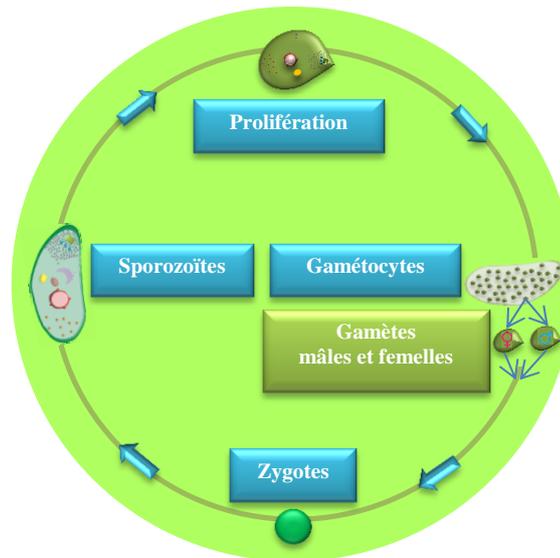


Figure 2 : Cycle de vie d'un parasite apicomplexe

I.4. Espèces d'apicomplexes

Comme évoqué précédemment, la diversité des apicomplexes est très grande tant au niveau de la diversité d'espèces qu'au niveau des hôtes et vecteurs de ces parasites.

Les différentes espèces d'apicomplexes sont :

-*Babesia spp* : responsable des affections de babésiose et de la piroplasmose.

-*Cryptosporidium spp* : responsable des affections de cryptosporidose.

-*Eimeria spp* : responsable des affections de coccidiose.

-*Gregarina spp* : responsable de cas anormaux de décès chez de nombreux organismes, notamment chez les mollusques.

-*Monospora spp* : responsable de décès notamment chez les crustacés.

-*Neospora spp* : responsable des infections de néosporose.

-*Plasmodium spp* : est responsable des infections de paludisme.

-*Theileria* : est responsable des infections de theilériose et de piroplasmose équine.

-*Toxoplasma gondii* : responsable des infections de toxoplasmose.

Durant cette thèse nous nous sommes principalement intéressés aux parasites *Plasmodium spp* et de façon moindre aux parasites *T. gondii* et *Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*).

I.4.1. *T. gondii*

Bien que *T. gondii* soit la seule espèce de *Toxoplasma* décrite aujourd'hui, des variations de virulence des différentes souches et isolats de ce parasite ont été observées. Il existe trois génotypes principaux (type I, II et III) regroupant les isolats et souches selon leur virulence.(17) De nombreuses études portent sur l'étude des gènes impliqués dans la pathogénicité de ces souches et isolats.(18)

Pour les sujets ne présentant pas de déficit immunitaire, la toxoplasmose est une maladie bénigne qui peut engendrer l'apparition d'une légère adénopathie cervicale, sans gravité pour le porteur. En revanche chez les sujets immunodéprimés, la maladie peut entraîner de graves dommages cérébraux.(19) Les transmissions congénitales de la toxoplasmose peuvent aboutir à un avortement spontané, à la mort prématurée du nourrisson ou à une rétinoblastome toxoplasmique pour l'enfant, c'est-à-dire une inflammation infectieuse de l'œil.(20) L'agent de la toxoplasmose étant responsable d'environ 54% des cas.

Le cycle de vie de *T. gondii* est complexe (*Figure 3*) (15) et passe par la transmission du parasite entre les hôtes à des stades spécifiques. Les félinés et notamment les chats domestiques, sont connus pour être les hôtes définitifs du parasite. Généralement, les félinés sont infectés lors d'ingestion de petits animaux, eux-mêmes infectés, tels que des souris ou des rats. Après ingestion des oocystes présents chez le petit animal (souris, rats ou oiseaux), les micro-organismes viables sont libérés et envahissent les cellules épithéliales de l'intestin grêle du chat. Lors de cette phase le parasite va subir un stade asexué puis un stade sexué qui va permettre la régénération des oocystes. Les oocystes seront ensuite excrétés via les fèces du féliné. Après excrétion, un temps d'incubation de 1 à 5 jours est nécessaire à la sporulation des oocystes, c'est-à-dire pour qu'ils deviennent infectieux. Après cette phase de sporulation, les oocystes peuvent survivre plusieurs mois dans la nature. Les oocystes sporulés sont très résistants puisqu'ils ne craignent pas les désinfectants, le gel ou les fortes températures. Néanmoins, une température de 70°C durant 10 min peut engendrer la mort du parasite. La toxoplasmose peut être inoculée aux êtres humains de différentes manières : l'ingestion de viande infectée non cuite (par exemple du bœuf), l'ingestion d'oocystes par contamination de matières fécales sur les mains ou la nourriture, par transplantation d'organe, par transfusion sanguine ou par transmission congénitale.

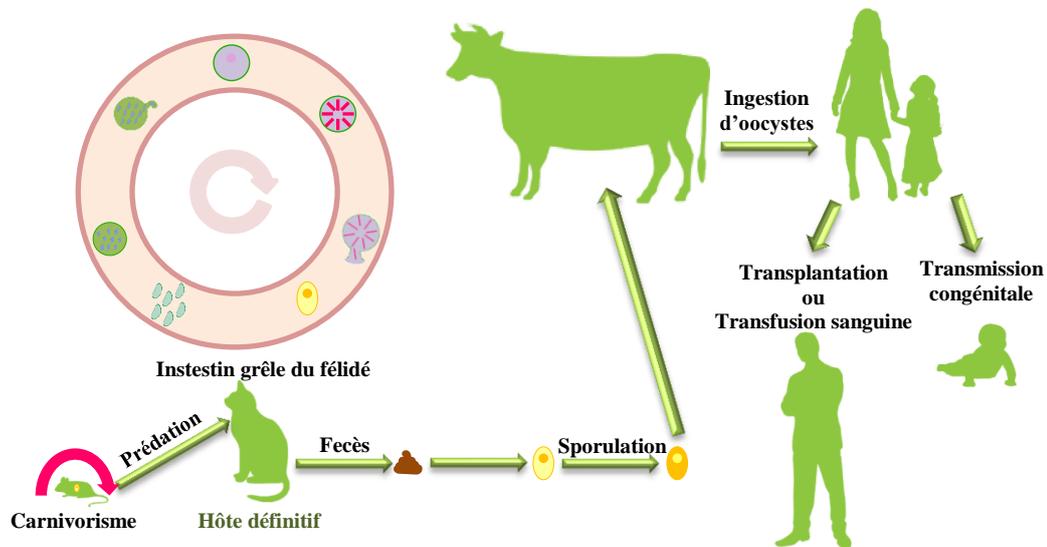


Figure 3 : Cycle de vie de *T. gondii*

I.4.2. *C. parvum*

Bien qu'il existe différentes espèces de *Cryptosporidium* capables d'infecter l'Homme, *C. parvum* est l'espèce la plus commune dans les infections humaines. Deux génotypes majeurs ont été déterminés à partir de l'analyse génétique d'isolats humains et animaux.(21)(22) Un génotype bovin, de type 2, a été retrouvé dans de nombreux isolats de différentes espèces animales mais aussi dans des isolats humains. L'autre génotype majeur est un génotype humain de type 1 qui n'affectent que les humains.

La cryptosporidiose a pour principaux symptômes des diarrhées abondantes et une mauvaise absorption des nutriments au cours de la digestion.(23) Pour les personnes possédant un système immunitaire normal, la durée de l'infection est de courte durée (maximum 2 semaines). Pour les enfants et les personnes âgées, les symptômes peuvent être plus longs et peuvent entraîner un retard de croissance chez l'enfant. Pour les personnes immunodéprimées(24), les diarrhées sont prolongées et peuvent devenir chroniques, pouvant ainsi entraîner directement ou indirectement le décès du patient. Chez les animaux, les symptômes sont principalement des diarrhées abondantes ainsi qu'une perte de poids importante, pouvant conduire au décès de l'animal.(25) Ces symptômes peuvent être plus intenses chez les jeunes animaux (par exemple le veau ou le porcelet).

Le parasite de la cryptosporidiose est capable de se développer à l'intérieur d'un seul hôte. L'infection démarre lors de l'absorption d'ocystes de *Cryptosporidium*, qui peut se faire par consommation d'eau ou d'aliments infectés.(26) En effet, dès l'ingestion et après fixation des ocystes dans le tractus gastro-intestinal, ces derniers vont s'ouvrir pour libérer des sporozoïtes infectieux. Cette étape est possible grâce à un processus de fixation des ligands présents à la surface du sporozoïte sur les récepteurs de la cellule hôte. Cet attachement va être à l'origine de modification dans la surface de la cellule hôte. Ces modifications vont engendrer la formation d'une vacuole autour du parasite.(27, 28) Le parasite va ensuite subir une phase asexuée de schizogonie qui va permettre la production de mérozoïtes. Ces mérozoïtes vont ensuite être rejetés dans la lumière de l'intestin où ils vont pouvoir infecter d'autres cellules épithéliales et se différencier en macrogamétocytes et microgamétocytes, qui sont les formes sexuées du parasite. La fécondation des macrogamètes par les microgamètes vont conduire à la production de nouveaux ocystes. Ces ocystes pourront soit être évacués de la cellule hôte puis libérés vers le monde extérieur via les fèces, soit être sporulés pour conduire à une auto-infection.(29)

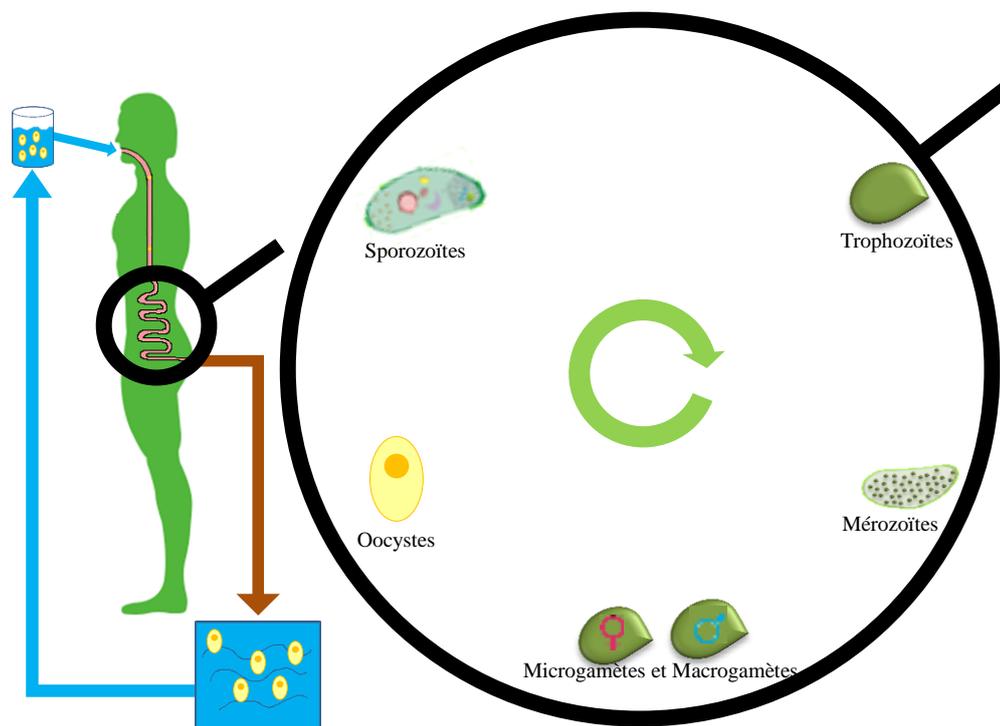


Figure 4 : Cycle de vie de *C. parvum*

II . *Plasmodium*

II.1. Le paludisme

II.1.1. Généralités

Malgré de nombreux progrès dans la lutte antipaludique, le paludisme reste un fléau pour l'humanité puisqu'il est encore potentiellement létal et concerne environ la moitié de la population mondiale. Selon l'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS), le paludisme serait à l'origine de 216 millions de cas et de 650 000 décès chaque année. Bien que ces chiffres restent alarmants, l'OMS a enregistré un recul de 25 % du taux de mortalité mondiale (33% en Afrique) par rapport à l'année 2000. La plupart des cas mortels concernent des enfants africains, dont on recense 1 décès chaque minute.(30)

Néanmoins, d'après Murray et coll.(31), ces chiffres seraient à contraster avec les résultats de leur étude qui annonce près de 1,24 million de décès par an, au lieu des 650 000 annoncés par l'OMS. Ces chiffres alarmants ont été réfutés par l'OMS lors d'un communiqué officiel. De tels écarts, s'expliquent par la différence des méthodes utilisées. L'étude de l'OMS s'appuie sur les rapports fournis par les gouvernements alors que celle de Murray et coll. s'appuie sur les chiffres fournis par les communautés.

Malgré la divergence des deux études, le combat contre le paludisme reste un enjeu mondial de santé publique.

En effet, selon l'OMS le paludisme pourrait être responsable d'une baisse d'environ 1,3% du produit intérieur brut (PIB) des pays à forte transmission. Dans les pays les plus touchés, les frais liés au paludisme concernent à la fois les ménages mais également les gouvernements, installant ainsi une spirale de pauvreté.(30)

II.1.2. Le parasite du paludisme : *Plasmodium*

Le paludisme est une maladie parasitaire dû à un parasite du genre *Plasmodium*. Comme vu précédemment, les parasites *Plasmodium* font partie du phylum des *Apicomplexa*. Depuis une dizaine d'année, la place des *Apicomplexa* dans la classification a été revue, grâce notamment aux avancées dans la compréhension de la biologie atypique de ces organismes. Récemment, les *Apicomplexa* ont été classés dans le groupe des *Alveolata*.(32)

Les espèces de *Plasmodium* sont nombreuses et peuvent infecter de nombreux vertébrés(33) tels que les oiseaux, les rongeurs, les reptiles, les singes... et les Humains (*Tableau 1*). La compétence vectorielle de chaque espèce lui permet d'être spécifique à une ou plusieurs espèces de vertébrés.

Sous-genre	Homme	Chimpanzés	Gorilles	Singes américains et asiatiques
	<i>P. (P.) malariae</i>	<i>P. (P.) malariae</i>	<i>P. (P.) schwetzi</i>	<i>P. (P.) brasilianum</i>
<i>Plasmodium</i>	<i>P. (P.) vivax</i>	<i>P. (P.) schwetzi</i>		<i>P. (P.) simium</i>
	<i>P. (P.) ovale</i>			<i>P. (P.) simiovale</i>
	<i>P. (P.) knowlesi</i>			<i>P. (P.) knowlesi</i>
Laverania	<i>P. (L.) falciparum</i>	<i>P. (L.) reichenowi</i>		

Tableau 1 : Plasmodies parasites de l'homme et des anthropoïdes africains et adaptés aux singes américains et asiatiques.(34)

II.1.3. Vecteurs du paludisme : l'anophèle femelle

Tous les vecteurs de *Plasmodium* de mammifères appartiennent à la famille des *Culicidae* et plus précisément à la sous famille des *Anophelinae*. Il existe trois genres dans cette sous-famille dont seul le genre Anophèle (*Figure 5*) est un vecteur du paludisme humain. On recense plus de 400 espèces d'anophèles(35) à travers le monde, néanmoins seules soixante-dix à quatre-vingts espèces seraient capables d'assurer le développement et la transmission du paludisme.(34) Ces espèces sont dites : "espèces compétentes".



Figure 5 : Anophèle gambiae(36)

Les facteurs environnementaux, qu'ils soient naturels ou artificiels, sont essentiels à la distribution et à l'abondance des vecteurs dans le monde. L'hétérogénéité de la distribution du paludisme dans le monde peut être expliquée par des conditions locales variables. La présence de sites larvaires adaptés, c'est à dire de collections d'eau où les femelles pondent leurs œufs, est essentielle à la reproduction des anophèles.

II.1.3.1. Cycle biologique de l'anophèle femelle

Le cycle biologique des anophèles (*Figure 6*) se divise en quatre stades. Les trois premiers stades sont aquatiques et comprennent les œufs, les larves et les nymphes. Le dernier stade adulte est aérien. La durée de chaque stade sera surtout dépendante de la température de l'eau. En effet, plus la température sera élevée, plus ce temps sera court.

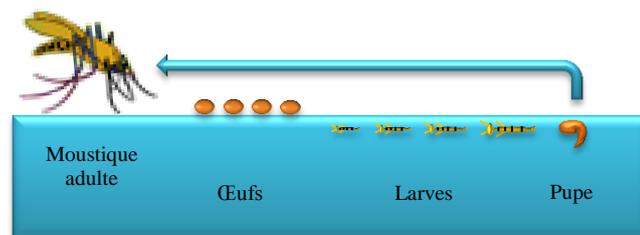


Figure 6 : Cycle biologique de l'anophèle femelle

La copulation n'a généralement lieu qu'une seule fois dans la vie d'une anophèle. L'anophèle conserve la semence dans des spermathèques afin de pouvoir féconder plusieurs lots d'œufs successivement. Dès la fin de la copulation, l'anophèle femelle a besoin d'un repas sanguin pour faire murir son premier lot d'œufs. La femelle prend ensuite un repas sanguin tous les deux jours pour porter à maturation les lots suivants d'œufs. La durée de vie d'une anophèle est d'environ deux mois en élevage et de un mois en conditions sauvages.

II.1.3.1.1. Stade œuf

Lors de la ponte, la femelle anophèle dépose environ cent œufs à la surface de l'eau. Les œufs sont maintenus à la surface de l'eau grâce à la présence de flotteurs. Le type de collection d'eau sera dépendante de l'espèce d'anophèle (taille, chaleur, végétation présente ou non...), néanmoins, il s'agira généralement de collection d'eau douce stagnante non polluée. L'éclosion des œufs se déroulera de 24 à 48 heures après la ponte, selon la chaleur environnante.

II.1.3.1.2. Stade larvaire

La larve sort de l'œuf et se place à côté de l'œuf, juste sous la surface de l'eau. La larve a une vie totalement aquatique mais a besoin d'air pour vivre. Lors de l'apparition d'un danger, la larve pourra plonger vers le fond de la collection d'eau mais remontera rapidement vers la surface pour respirer. La larve se nourrit des petites particules en suspension dans l'eau. Le développement des larves dépend de la température ambiante, les conditions optimales sont situées entre 20 et 30°C.

Le stade larvaire se décompose en quatre stades. Un jour ou deux après l'éclosion de l'œuf, la première larve mue et devient la seconde larve. Cette larve va devenir successivement troisième et quatrième larve avec des intervalles d'environ deux jours. Ce dernier stade larvaire dure environ trois jours, amenant le stade larvaire à une durée totale de huit à dix jours.

II.1.3.1.3. Stade pupaire

Après une dizaine de jour, la larve va se transformer en pupe. La pupe, appelée également nymphe, a la forme d'une virgule et est l'un des stades déterminants pour l'anophèle puisque c'est durant cette période que l'anophèle va passer du stade aquatique au stade aérien. La pupe ne se nourrit pas et reste juste en dessous de la surface de l'eau. Tout comme la larve, elle est capable de plonger au fond de la collection d'eau pour se protéger des prédateurs. Ce stade pupaire dure de deux à trois jours, jusqu'à l'ouverture de la carapace de la nymphe.

II.1.3.1.4. Stade adulte (ou imago)

Après l'ouverture de la nymphe et la libération de l'anophèle adulte, le moustique va se reposer à la surface de l'eau jusqu'à ce qu'il soit capable de s'envoler.

Dès son premier envol, l'anophèle va procéder à la copulation. Comme vu précédemment, les anophèles vont procéder à leur premier repas sanguin juste après la copulation. Néanmoins, il est important de souligner que le moment exact du repas se fait préférentiellement la nuit. Selon les espèces, les piqûres peuvent avoir lieu juste à la tombée de la nuit ou beaucoup plus tard jusqu'au petit matin. On classe les espèces selon leurs habitudes alimentaires : les endophages, qui se nourrissent exclusivement dans les habitats humains et les exophages qui se nourrissent à l'extérieur.

Les anophèles repèrent les hôtes à distance grâce tout d'abord aux émissions de gaz carbonique de ceux-ci puis grâce aux odeurs corporelles.(37) Cela pourrait expliquer les préférences trophiques des différentes espèces. Une étude a montré que les porteurs de gamétocytes seraient plus attractifs pour les anophèles de l'espèce *gambiae*(38), ce qui augmente le risque de transmission.

II.1.4. Agents pathogènes humains du paludisme

II.1.4.1. Généralités

Il existe cinq espèces de *Plasmodium* capables d'infecter l'homme :

-*Plasmodium ovale* (*P. ovale*)

-*Plasmodium malariae* (*P. malariae*)

-*Plasmodium vivax* (*P. vivax*)

-*Plasmodium knowlesi* (*P. knowlesi*)

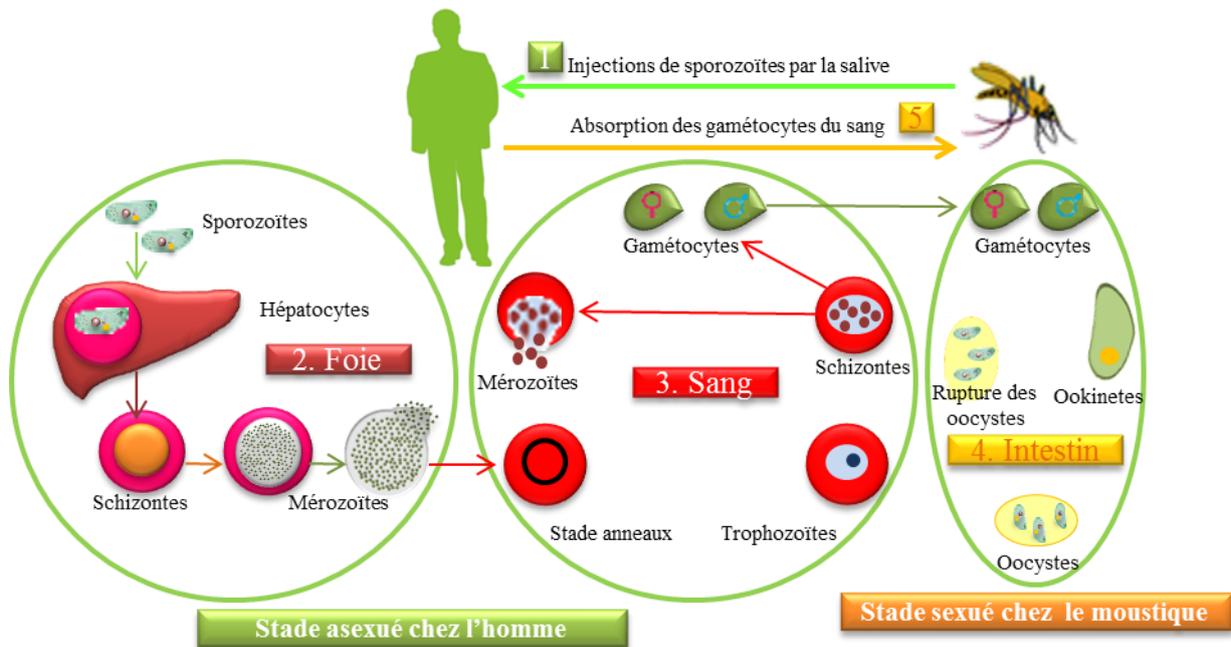
-*Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*)

P. ovale et *P. malariae* sont considérées comme des formes relativement rares, du fait de leur répartition inégale et limitée. Selon certaines études, l'absence d'examen microscopique du sang des malades et la grande similarité des différentes espèces de *Plasmodium* pourraient expliquer le manque de rapport sur *P. ovale*.(39)

P. vivax et *P. falciparum* sont les espèces les plus répandues. En effet, dans certaines régions du monde, la proportion de cas de paludisme dû à *P. falciparum* sont de 100% (notamment dans les pays Afrotropicaux).(40) Néanmoins, au Pakistan, en Iran et en Afghanistan, l'espèce majoritaire est *P. vivax*.(40) Il est à noter que *P. falciparum* est considéré comme l'espèce engendrant le plus de décès.

P. knowlesi était connu dans les infections de paludisme chez le singe, ce n'est que très récemment qu'il a été reconnu cinquième espèce humaine.(41, 42)

Durant cette thèse, nous nous sommes uniquement intéressés à *P. falciparum*, aussi, seule cette espèce sera décrite dans la suite de ce rapport.

II.1.4.2. Cycle de vie de *P. falciparum*Figure 7 : Cycle de vie de *P. falciparum*

Au cours de son cycle de vie complexe(43), le parasite *Plasmodium* va subir une série de transformations : une phase asexuée qui se déroule chez l'Homme suivi d'une phase sexuée qui débute chez l'Homme et se termine chez le moustique (Figure 7). Ces différents changements vont permettre aux parasites d'échapper totalement ou en partie aux défenses immunitaires de leurs deux hôtes successifs.

Lors du repas sanguin de l'anophèle femelle infectante, le *Plasmodium* pénètre dans l'organisme de l'hôte, sous forme de sporozoïtes qui envahissent les cellules du foie, les hépatocytes. Le parasite subit ensuite une phase de schizogonie hépatique, c'est-à-dire une phase d'amplification et de production de mérozoïtes. Les mérozoïtes ainsi produits envahissent les hématies de l'hôte humain, initiant la phase érythrocytaire.

Après plusieurs cycles, certains parasites se différencient en gamétocytes, capables d'infecter à nouveau un moustique lors du repas de sang. La phase sexuée peut alors se dérouler dans le corps du moustique. Cette phase sera suivie d'une nouvelle phase d'amplification et de production d'oocystes. Cette phase dure généralement de 10 à 14 jours, produisant finalement des sporozoïtes capables de contaminer à nouveau un hôte humain lorsque le moustique femelle prendra un nouveau repas de sang.

II.1.4.2.1. Phase asexuée chez l'hôte

Lors de la piqûre d'une anophèle femelle, le parasite *Plasmodium* est inoculé sous forme de sporozoïtes. Le nombre de sporozoïtes injectés est compris entre 10 et 100. Une heure environ après le repas sanguin, les sporozoïtes migrent vers le foie grâce à la circulation sanguine. Les sporozoïtes sont ensuite divisés en schizontes hépatiques. Cette phase est appelée phase pré-érythrocytaire ou exo-érythrocytaire du parasite. La durée de la phase exo-érythrocytaire est variable pour chaque espèce. Chez *P. falciparum*, la durée de maturation est la plus courte et est de 5 jours et demi.

Après une dizaine de jours, les schizontes hépatiques deviennent matures puis se différencient en mérozoïtes à l'intérieur des hépatocytes. Les mécanismes de transport de ces mérozoïtes vers les hématies de l'hôte ont fait l'objet de nombreuses recherches. L'équipe du Professeur Ménard de l'Institut Pasteur, a démontré que le parasite utilise un véritable « cheval de Troie » pour passer du foie vers la circulation sanguine, échappant ainsi au système immunitaire de l'hôte. Ils ont démontré qu'une fois infectés et remplis de mérozoïtes, les hépatocytes meurent puis bourgeonnent en formant des mérosomes. Ces mérosomes vont ensuite gagner les vaisseaux sinusoïdes du foie puis la circulation sanguine où les mérozoïtes seront libérés.(44) La composition de la membrane des mérosomes a fait l'objet de controverses.(45) En effet, trois membranes différentes pourraient être à l'origine de la membrane des mérosomes : la membrane du parasite, la membrane de la vacuole parasitophore et la membrane de la cellule hôte. Il avait été émis que la membrane de la cellule hôte serait à l'origine de celle des mérosomes car cela serait plus bénéfique pour le parasite. En effet, le parasite n'aurait pas à gaspiller de l'énergie pour construire une membrane supplémentaire. De plus, la membrane de la cellule hôte pourrait servir de camouflage au parasite et lui permettre de passer aisément dans la circulation sanguine. En effet, la grande majorité des antigènes parasitaires seraient alors masqués jusqu'à ce que les mérozoïtes soient libérés dans les capillaires pulmonaires. Graewe et coll. ont démontré, par imagerie, que la membrane de la cellule hôte est à l'origine de la formation de la membrane des mérosomes.(45)

Une fois dans la circulation sanguine, les mérozoïtes libérés vont rapidement envahir les hématies de l'hôte. Dès l'invasion du globule rouge par le mérozoïte, le stade érythrocytaire démarre et le parasite va subir une première transformation en trophozoïte jeune, également appelé anneau, puis ils se transforment en trophozoïtes puis en schizontes érythrocytaires. Ces schizontes comportent des noyaux-fils. Ces noyaux donnent un mérozoïte lorsque le globule rouge éclate, pouvant ainsi parasiter d'autres hématies saines, etc... C'est ce que l'on nomme le cycle intra-

érythrocytaire, dont la durée est variable selon les espèces de *Plasmodium*, et est de 48h chez *P. falciparum*. C'est lors de ce cycle que les symptômes du paludisme apparaissent.

Il est à noter qu'à part la primaquine, tous les médicaments antipaludiques actuels agissent sur cette phase.

Après plusieurs cycles, certains parasites se différencient en gamétocytes qui pourront être absorbés par un moustique lorsqu'il piquera la personne contaminée.(46)

II.1.4.2.2. Phase sexuée chez l'anophèle femelle

Lors d'un repas de sang sur une personne infectée, l'anophèle absorbe entre 10 et 1000 gamétocytes mâles et femelles. Dans son estomac, ils se transforment en gamètes mâles (huit gamètes mâles pour un gamétocyte mâle) et en gamètes femelles (une gamète femelle par gamétocyte femelle).

La fusion des gamètes mâles et femelles vont conduire à la formation d'un zygote qui est un œuf mobile. L'ookinète traverse ensuite la membrane péritrophique, c'est-à-dire la membrane intestinale qui délimite l'espace endopéritrophique contenant le sang à digérer et l'espace ectopéritrophique contenant les produits digérés. Entre un et dix oocystes sont ensuite formés puis se divisent immédiatement. Les cellules de l'oocyste s'allongent et se transforment en sporoblastes puis en sporozoïtes. Lorsque ces sporozoïtes sont formés, la paroi de l'oocyste se déchire pour les libérer. Ils achèvent leur maturation dans la cavité générale de l'insecte avant de gagner les glandes salivaires de l'anophèle où leur nombre varie entre 1000 et 10000 sporozoïtes.(46)

Ces sporozoïtes sont alors capables de contaminer à nouveau un hôte humain lorsque le moustique femelle prendra un nouveau repas de sang.

II.1.5. Clinique

II.1.5.1. Symptômes généraux

Dans le cas d'un paludisme non-complicé, les premiers symptômes du paludisme ne sont pas spécifiques et ressemblent aux symptômes d'une maladie virale mineure. Ces symptômes sont : inconfort abdominal, maux de tête, lassitude, fatigue, douleurs musculaires et articulaires, généralement suivie par de la fièvre, des frissons, une transpiration excessive, de l'anorexie, des vomissements et malaises. Le diagnostic est donc difficile, ce qui engendre des sur-diagnosics,

notamment dans les zones endémiques. À ce stade précoce, s'il n'y a pas de trace de dysfonctionnement des organes vitaux, les patients peuvent être facilement traités. Néanmoins, il faut noter que si les médicaments prescrits sont inefficaces ou si le traitement est retardé, en particulier dans le paludisme dû à *P. falciparum*, la charge parasitaire peut continuer à augmenter et ainsi engendrer un paludisme sévère. Ce type de progression peut se produire en quelques heures.

Le paludisme grave se manifeste habituellement par un ou plusieurs des symptômes suivants: coma (paludisme cérébral), acidose métabolique, anémie sévère, hypoglycémie, insuffisance rénale aiguë ou œdème pulmonaire aigu. A ce stade de la maladie, le taux de létalité chez les personnes recevant un traitement est généralement de 10 à 20%. Toutefois, s'il n'est pas traité, le paludisme grave est mortel dans la majorité des cas.

II.1.5.2. Les formes graves de paludisme

II.1.5.2.1. Le paludisme cérébral

Le paludisme cérébral, également appelé neuropaludisme, est la forme la plus grave de cette maladie. La physiopathologie du neuropaludisme n'est pas encore totalement élucidée. L'une des premières hypothèses envisagées serait la diminution du flux sanguin au niveau des capillaires cérébraux, dû à la déformabilité réduite des hématies parasitées. La seconde hypothèse serait l'augmentation de la perméabilité capillaire qui engendrerait la formation d'un œdème cérébral. Néanmoins, divers études vont à l'encontre de ces hypothèses.(47)

Des mécanismes mécaniques pourraient être à l'origine du neuropaludisme. En effet, ce phénomène reposerait sur la cytoadhérence des hématies parasitées qui s'agrègeraient pour former des « rosettes » et entraîneraient une réduction du flux cérébral.(47)

Des mécanismes immunologiques ont également été proposés. Cependant, ils restent encore mal établis puisqu'ils reposent essentiellement sur l'expérimentation animale. Le rôle des cytokines a fait l'objet de nombreux travaux. En effet, des taux de TNF α (facteur de nécrose tumorale) élevés seraient corrélés à une surmortalité et à des manifestations neurologiques, d'autre part le TNF α multiplierait les récepteurs endothéliaux (ICAM1, molécule d'adhésion intracellulaire de type 1 est une protéine impliquée dans les phénomènes inflammatoires) aux hématies parasitées provoquant la cytoadhérence.(47)

Très récemment, Porcherie et coll. ont démontré que le développement du neuropaludisme serait lié à la mise en place d'un processus inflammatoire de type allergique. En effet, le parasite induirait la production d'un récepteur aux anticorps de type Immunoglobulines E (IgE) sur les globules blancs de type neutrophiles. Or, les neutrophiles sont généralement dépourvus de ce type de récepteurs. La fixation des IgE sur les récepteurs provoquerait alors une cascade d'événements inflammatoires à l'origine du neuropaludisme.(48)

Selon l'OMS, le paludisme cérébral peut être évalué selon les éléments suivants :

- un score inférieur ou égal à deux sur l'échelle de coma de Blantyre : échelle comprise entre 0 et 5 (0 étant le plus mauvais score), calculée en fonction des réactions motrices, des mouvements oculaires et du langage.
- parasitémie causée par *P. falciparum*, révélée par frottis sanguin.
- absence d'autres causes évidentes de coma (par exemple méningite ou hypoglycémie).(49)

Le diagnostic définitif du paludisme cérébral repose sur l'examen *post mortem* du cerveau, soit par autopsie ou par biopsies.(50) D'autre part, la présence d'une rétinopathie palustre, après ophtalmoscopie, conforte le diagnostic de paludisme cérébral.(51, 52)

II.1.5.2.2. Le paludisme chez la femme enceinte

Les femmes enceintes ayant une immunité naturelle faible présentent un risque accru de développer un paludisme sévère, notamment dans les cas d'infection à *P. falciparum*. De plus, le nombre de décès chez les femmes enceintes est supérieur à celui observé chez les autres femmes.

Les principales complications observées sont l'hypoglycémie, une détresse respiratoire, et la perte du fœtus. Généralement, l'administration rapide d'un traitement est essentielle à la survie de la mère.

Historiquement, le médicament recommandé aux femmes enceintes, dans le traitement du paludisme sévère, était la quinine mais ce médicament provoquerait une hyperinsulinémie et de l'hypoglycémie.(53) Désormais, des dérivés de l'artémisinine sont recommandés, notamment pour les second et troisième trimestres, car ils agissent plus rapidement et ne causent pas d'hypoglycémie.(54)

Lors de la grossesse, le placenta protège le fœtus du système immunitaire de la mère. De plus la création d'une barrière physiologique placentaire va engendrer la suppression du système immunitaire innée de la mère. L'absence de cette immunité pourrait conduire à l'augmentation de la sensibilité du paludisme pendant la grossesse et une augmentation des symptômes de la maladie.(55, 56)

Il existe un paludisme dit placentaire, causé par l'accumulation des hématies parasitées dans l'espace intervilloux du placenta. Suite à cette accumulation, des modifications pathologiques vont intervenir au niveau du placenta et ainsi entraîner des altérations dans les interactions materno-fœtales.(57) Les effets du paludisme placentaire peuvent engendrer un faible poids pour le nourrisson, des retards moteurs et cérébraux.(58)

II.1.5.3. La lutte antipaludique

L'éradication du paludisme ne peut pas être accomplie uniquement à l'aide de traitements médicamenteux. La lutte antipaludique doit être réalisée grâce à la synergie de plusieurs mesures telles que la lutte anti-vectorielle qui permet de réduire les transmissions et donc le nombre de cas, l'amélioration des diagnostics afin de diminuer les décès et de réduire les transmissions, et le développement de nouveaux traitements et vaccins.

Un partenariat mondial est également essentiel à l'efficacité de cette lutte. L'OMS joue un rôle central dans la lutte antipaludique. De plus le partenariat « roll back malaria » (RBM, faire reculer le paludisme) ; qui a été initié en 1998 par l'OMS, l'Unicef, le PNUD et la banque mondiale ; regroupe aujourd'hui plus de 500 partenaires au niveau mondial. RBM regroupe le secteur privé, les pays endémiques, leurs partenaires de développement bilatéraux et multilatéraux, des fondations, des organisations non gouvernementales et communautaires ainsi que des institutions universitaires et de la recherche.

II.1.5.3.1. La lutte anti-vectorielle

La lutte anti-vectorielle peut être réalisée à trois niveaux : au stade larvaire, au stade imagal et en contrôlant les contacts entre les Hommes et les anophèles.

II.1.5.3.1.1. Contrôle larvaire

Le contrôle larvaire vise à réduire la densité vectorielle. Cette solution doit être accompagnée d'un contrôle imagal pour réduire efficacement la capacité vectorielle.

La réduction des gîtes larvaires (remblai, drainage, éclaircissement de la végétation...) permet d'empêcher les anophèles de se reproduire en les privant de leurs moyens de survie (nourriture, repos...), néanmoins, il est important de noter que de telles mesures entraînent des modifications environnementales. De plus, de nombreuses activités liées au développement, comme les canaux d'irrigation, sont à l'origine d'augmentation du risque de transmission du paludisme. Les projets de développement devront être particulièrement suivie afin d'éviter la création de collections d'eaux stagnantes qui pourraient favoriser le développement larvaire.

L'introduction de poissons larvivores dans les zones à risque peut permettre une réduction significative des vecteurs. Les poissons larvivores sont des poissons se nourrissant exclusivement de larves de moustiques. Les deux espèces les plus utilisées sont les *Gambusia affinis* (ou poissons topminnow), utilisés en eaux claires et les *Poecilia reticulata* (ou guppy) utilisés en eaux polluées. Néanmoins, les autorités évaluent la capacité des poissons locaux à contrôler les populations de moustiques car l'introduction de poissons non endémiques pourrait conduire à un dérèglement de la faune et la flore locale.

Les deux méthodes précédentes ne peuvent pas être utilisées dans certains types de gîte larvaire. C'est pourquoi, l'utilisation de larvicides (agents chimiques, agents biologiques ou toxines) a été envisagée. Cependant, les larvicides ne peuvent être employés que pour des collections d'eaux permanentes ou semi-permanentes, pouvant être identifiées et traitées et où la densité de la population humaine à protéger est suffisamment élevée pour justifier le traitement des gîtes à intervalles relativement rapprochés. Ces prérequis réduisent donc fortement l'utilisation des larvicides.

II.1.5.3.1.2. Contrôle adulte

Les pulvérisations intra domiciliaires résiduelles ont été fortement utilisées dans les années 50-60 et ont permis de contrôler significativement le paludisme qui a été éradiqué de plusieurs parties du monde. Néanmoins, l'emploi continu à grande échelle de ces insecticides ne peut pas être constant à cause des risques environnementaux, du prix et du développement des résistances des anophèles envers ces insecticides. L'efficacité des insecticides sera donc directement liée : à la sensibilité de la population vectorielle envers l'insecticide choisi, au fait que les anophèles présentes soient principalement endophiles, au fait que les habitations offrent des surfaces pulvérisables et que cette application pourra être faite correctement. Il est donc important de connaître parfaitement

la sensibilité des vecteurs locaux, la géographie de la région à traiter afin de pouvoir traiter toutes les habitations et les coûts engendrés par un tel traitement.

Le développement de résistances⁽⁵⁹⁾ aux insecticides utilisés est une menace importante dans tous les programmes basés sur l'utilisation répétée et/ou prolongée de ces produits. Des précautions particulières devront être prises en fonction du contexte d'utilisation : étudier l'historique du développement des résistances dans la région concernée, dosage suffisant des insecticides, restriction des surfaces et des périodes de pulvérisation.

Le contrôle imagal (ou adulte) peut être également réalisé grâce à l'utilisation de champignons entomopathogènes.⁽⁶⁰⁾ Contrairement aux virus et aux bactéries, les pathogènes fongiques pourraient infecter le moustique par simple contact avec les cuticules du champignon. Après leur dépôt sur certaines surfaces, les spores peuvent persister durant plusieurs mois.⁽⁶⁰⁾ De plus, une action synergique de ces agents pathogènes avec certains insecticides (notamment les pyréthriinoïdes) a été démontré.^(61, 62) Fang et coll.⁽⁶³⁾ ont inséré un gène synthétique dans *Metarhizium anisopliae* (un champignon entomopathogène) qui exprime une protéine hybride, permettant ainsi de réduire le développement de *Plasmodium* chez le vecteur du paludisme. La protéine hybride est issue d'un croisement entre SM1 (salivary gland and midgut peptide 1) et la scorpine. SM1 pourrait se fixer à la surface des glandes salivaires du moustique et ainsi empêcher l'entrée des sporozoïtes.⁽⁶⁴⁾ La scorpine est un peptide antimicrobien dont la structure ressemble à un hybride entre une défensine et une cécropine. Il présente une activité antibactérienne et inhibe le développement sporogonique des parasites responsables du paludisme murin.⁽⁶⁵⁾

A la fin des années 90, le développement de lignées stables de moustiques génétiquement modifiés, a ouvert la voie aux recherches génétiques visant la réduction de la compétence des vecteurs.⁽⁶⁶⁾ De nombreuses études ont été effectuées^(67–70), néanmoins l'application de ces recherches en dehors des laboratoires reste difficile. En effet, au-delà de l'impact social et environnemental de l'utilisation de moustiques génétiquement modifiés, les approches de modifications génétiques doivent encore être exploitées.⁽⁷¹⁾

II.1.5.3.1.3. Contrôle du contact entre les Hommes et les anophèles

La réduction du contact entre les Hommes et les anophèles peut être réussie grâce à l'utilisation de moustiquaires ou textiles imprégnés d'insecticides, à l'amélioration des habitats et à l'utilisation de répulsifs.

Les moustiquaires imprégnées permettent une bonne protection personnelle dans les groupes à haut risque ainsi qu'un contrôle élevé de la transmission avec une couverture importante de la population (80%). Les aspects socio-économiques, techniques, économiques et opérationnels doivent être particulièrement étudiés puisqu'ils sont en corrélation directe avec l'efficacité de ces systèmes de protection. De plus, le manque d'alternative dans le choix des insecticides utilisés pour l'imprégnation et l'apparition possible de résistance(72), est source d'inquiétude pour les autorités. Il existe des moustiquaires imprégnées dites de longue durée qui ne nécessitent pas de ré-imprégnation avant 4-5 ans. D'autres textiles peuvent être également traités, tel que les rideaux, les hamacs. Les rideaux peuvent être un bon complément aux moustiquaires car ils permettent d'éviter que les moustiques n'entrent dans l'habitation avant l'heure du coucher.

L'amélioration de l'habitat est également très importante dans la lutte antipaludique. En effet, les zones où les habitations sont frustes sont généralement plus exposées au risque palustre. Les maisons incomplètes (mur manquant, absence de plafond, absence de portes et de fenêtres) permettent le libre accès de l'habitation par les moustiques. De plus, les problèmes d'humidité peuvent favoriser le repos des anophèles et ainsi augmenter les risques de transmission du paludisme.

Les répulsifs et les vêtements protecteurs sont surtout utilisés en extérieur pendant les pics d'activité des vecteurs. Les répulsifs se présentent sous la forme de crèmes, spray, bracelets et de spirales insecticides et ont une durée d'action comprise entre six à huit heures. Les vêtements protecteurs couvrent la plus grande partie du corps pouvant permettre un bon niveau de protection personnelle contre les piqûres.

II.1.5.3.2. Diagnostics

L'OMS recommande de procéder à une confirmation parasitologique rapide du diagnostic avant toute administration de traitement antipaludique aux patients suspectés d'être infectés. Cette vérification peut être faite soit par examen microscopique soit par test de diagnostic rapide, elle permet d'adapter parfaitement le traitement. Les tests de diagnostic rapide se présentent, le plus souvent, sous la forme d'une bandelette qui est plongée dans des puits contenant du sang et une solution tampon. Un changement de couleur de la bandelette indique la présence d'antigènes spécifiques produits par le parasite du paludisme, dans le sang du patient. Une étude, portant sur l'évaluation de l'efficacité des tests de diagnostic rapide présents sur le marché, a été menée par l'OMS. Les résultats de cette étude ont montré que ces tests pouvaient présenter des résultats dits

faux positifs, c'est-à-dire que le test réagissait de façon positive pour des personnes n'étant pas atteintes du paludisme. D'autre part, cette étude a permis de montrer qu'un grand nombre des tests actuels présentent une bonne stabilité aux hautes températures et à l'humidité. La facilité d'utilisation et d'interprétation des résultats a également été étudiée, les bandelettes ont été considérées comme les formats les moins pratiques et les moins faciles d'utilisation. Les tests sous forme de cassette (petite carte en plastique) sont préférés aux tests sur bandelettes.(73)

II.1.5.3.3. Les traitements

II.1.5.3.3.1. Médicaments antipaludiques

Depuis l'introduction des premières molécules antipaludiques de synthèse, il y a environ 70 ans, seul un petit nombre d'entre elles ont été utilisées comme traitement. Les principales classes sont décrites ci-après (*Tableau 2*).

Famille chimique	Médicaments
Amino-4-quinoléines	Chloroquine, amodiaquine, pipéraqune
Aminoalcools	Quinine, quinidine, mefloquine, halofantrine, luméfantine
Sulfonamides ou sulfones	Sulfadoxine, sulfalène, dapsone
Biguanides	Proguanil, chlorproguanil
Diaminopyrimidine	Pyriméthamine
Amino-8-quinoléines	Primaquine
Lactones sesquiterpènes	Artémisinine, artéether, artémether, artésunate, dihydroartémisinine
Naphtoquinone	Atovaquone
Antibiotics	Azythromycine, clindamycine, doxycycline, tétracycline

Tableau 2 : Principaux médicaments antipaludiques disponibles

Dans la médecine traditionnelle chinoise, la plante *Artemisia annua* est connue depuis environ 2000 ans dans le traitement des fièvres.(74) En 1967, dans le cadre d'un vaste programme de recherche antipaludique (projet 523), des extraits de cette plante ont été testés contre le paludisme et ont révélés une activité antipaludique puissante.(75) En 1972, le principe actif a été isolé, purifié et nommé artémisinine (*Figure 9*, nom donné par les occidentaux).(76) Après avoir démontré l'efficacité de cette molécule sur modèles animaux, des tests ont débuté chez l'Homme en Chine.(77) Ces tests ont permis de démontrer l'activité rapide et efficace de l'artémisinine, même sur des souches CQ-résistantes. Néanmoins, les traitements à base d'artémisinine sont coûteux,

c'est pourquoi des analogues semi-synthétiques ou synthétiques de cette molécule ont été développés.(78)

Depuis 2001, l'OMS recommande l'utilisation de l'artémisinine ou de ses dérivés, en association avec des antipaludiques d'action rapide (ex : chloroquine, quinine...), dans les zones où des résistances sont connues pour les monothérapies. Ces associations se nomment « Artemisin Combination Therapies » (ACT).(79) Le but principal de ces ACTs est de lutter contre le développement des résistances.

Malheureusement, en 2008, des cas de résistance à l'artémisinine ont fait leur apparition à la frontière entre le Cambodge et la Thaïlande.(80) De plus, des résistances ont été observées pour les dérivés de l'artémisinine, comme par exemple l'artésunate (*Figure 9*).(1) Néanmoins, malgré les changements de sensibilité du parasite envers l'artémisinine et ses dérivés, l'OMS considère que le taux d'échec des ACT est faible (moins de 10%).(1)

Dans les années 1800, la quinine (*Figure 11*) a été extraite de l'écorce d'un arbuste, le *Cinchona officinalis* également appelé quinquina.(81) (82) Malgré l'ancienneté de cette molécule, la quinine (et son isomère : la quinidine, *Figure 11*) reste l'un des médicaments les plus importants pour le traitement du paludisme non compliqué.(81) De plus, la quinine est l'un des médicaments utilisés en dernier recours pour le traitement du paludisme grave.(53) Néanmoins, les problèmes de toxicité(83) de la quinine ont incité les scientifiques à développer des analogues synthétiques de cette molécule. De plus, des cas de résistance ont été rapportés dans les années 1960 au Brésil et en Asie du Sud-Est.(84)

La chloroquine (*Figure 8*) a été synthétisée pour la première fois en 1934 par la société Bayer.(85) Cette molécule s'est rapidement révélée efficace et peu coûteuse et a été largement utilisée dans les années 1940. Cependant, dès 1957, les premiers cas de résistance à la CQ chez *P. falciparum* sont apparus en Thaïlande et en Amérique du Sud.(86) Cette résistance s'est rapidement répandue sur ces deux continents, puis en Afrique où elle concerne aujourd'hui plus de 85 % des régions.

En 1955, l'amodiaquine (*Figure 8*) a été découverte, cette molécule est en fait une pro-drogue de la monodéséthylamodiaquine. L'amodiaquine a tout d'abord été utilisée comme molécule concurrente à la chloroquine. Puis elle a été utilisée comme traitement prophylactique dès la mise en évidence de problèmes de toxicité hématologique et hépatique.(85) L'amodiaquine a ensuite été

utilisée comme traitement, en association avec l'artésunate. Des études ont montré que cette ACT est bien tolérée par les patients.(87) D'après l'OMS, la combinaison artésunate-amodiaquine a été choisie par de nombreux pays comme traitement de première intention dans les cas de paludisme non-complicé.(1) Malheureusement, des cas de haute résistance à l'amodiaquine ont fait leur apparition en Tanzanie.(88)

La méfloquine (*Figure 10*) a été introduite dans le milieu des années 1970.(74) Cette molécule est efficace sur des clones hautement résistants à la chloroquine.(89) Néanmoins, aux doses recommandées, la méfloquine engendre de graves effets secondaires, tels que de la dépression, des crises de panique...(90) De plus, dans les années 80, soit quelques années après son introduction, les résistances à la méfloquine ont fait leur apparition, notamment au Cambodge et en Thaïlande.(91)

En 1952, la primaquine (*Figure 12*) a été présentée comme un antipaludique de choix dans le traitement du paludisme dû à *P. vivax*.(92) Toutefois, les effets indésirables, telle que l'hémolyse, engendrés par la prise de ce médicament, interdisent le traitement chez les femmes enceintes.(92, 93) Les problèmes d'hémolyse concernent essentiellement les patients déficients en Glucose-6-phosphate Déhydrogénase (G6PD), les mécanismes d'induction du phénomène d'hémolyse n'ont pas encore été totalement élucidés.(94, 95)

Dans les années 60, la pipéraquline (*Figure 12*) a été développée simultanément par la société Rhône-Poulenc et des chercheurs chinois. Cette molécule a été largement utilisée dans les années 80 en Chine. Malheureusement, des problèmes de résistances sont rapidement apparus. Aujourd'hui, la pipéraquline est toujours utilisée, mais en association (ACTs) afin de limiter l'apparition de nouvelles résistances.(1, 83)

L'halofantrine a été développée à l'Institut de recherche « Walter Reed Army » en collaboration avec SmithKline Beecham et l'OMS / TDR à la fin des années 1960 et au début des années 1970, en tant que remplaçant de la méfloquine dans les cas de paludisme dus à des clones CQ-résistant de *P. falciparum*.(96) Le développement commercial de cette molécule a commencé dans les années 80. Cependant, dès 1993, les premiers cas de décès associés à la prise d'halofantrine ont été rapportés.(97) Aujourd'hui, ce médicament est utilisé de manière limitée dans les zones où les autres molécules antipaludiques n'ont plus d'efficacité.(96)

La luméfántrine (*Figure 10*) a été synthétisée en 1970 par l'Institut de Sciences Médicales Militaires de Beijing, en Chine puis a été enregistrée comme antipaludique en 1987.(98) La luméfántrine est très soluble dans les graisses insaturées et doit être prise avec un repas gras pour faciliter son absorption.(98) Or cela pose de nombreux problèmes puisque les populations à risque n'ont bien souvent pas accès à ce type de repas. D'autre part, des clones résistants à la luméfántrine ont pu être obtenus en laboratoire mais aucun cas de résistance n'a été observé sur le terrain.(99) La luméfántrine est toujours utilisée en association avec l'artéméther.(1, 99)

La sulfadoxine (*Figure 8*) est toujours utilisée en association avec la pyriméthamine (*Figure 8*). Cette combinaison a été introduite en 1960 en Thaïlande.(100) Ce n'est qu'en 1987 que cette association, nommée Fansidar, fut approuvée par la Food and Drug Administration (FDA). Bien que le Fansidar soit toujours utilisé dans certains pays, son utilisation est limitée par l'apparition d'effets secondaires graves, comme le développement de syndrome de Stevens-Johnson (érythème).(96) D'autre part, le parasite a développé rapidement des résistances au Fansidar, notamment en Thaïlande.(100, 101)

En 2000, la malarone a été approuvée par la FDA pour la prévention et le traitement du paludisme dû à *P. falciparum*. La malarone est une combinaison d'atovaquone et de proguanil. Le proguanil a été approuvé par la FDA en 1948 comme agent antipaludique. Néanmoins, il n'a pas été largement utilisé et son utilisation en monothérapie a été arrêtée en 1970. Il est à noter que la résistance au proguanil a été reconnue en 1950. Bien que la malarone ait peu d'effets indésirables, le coût de ce médicament rend son utilisation limitée.(96)

Plusieurs antibiotiques ont montré un effet antipaludique. Néanmoins, l'effet antipaludique n'est pas immédiat et n'intervient qu'après deux cycles du parasite. Cette attente peut s'avérer fatale pour les patients non immunisés, c'est pourquoi les antibiotiques ne sont utilisés que sous forme de combinaisons avec d'autres médicaments d'action rapide (par exemple avec la quinine, ou l'artésunate).(1, 83) La doxycycline est un antibiotique à large spectre qui peut être utilisée dans le cadre du traitement prophylactique du paludisme, elle est commercialisée sous le nom de Doxypalu®.

II.1.5.3.3.2. L'OMS et les traitements actuels(54)

II.1.5.3.3.2.1. Les objectifs des traitements actuels

Les différents traitements donnés aux malades atteints de paludisme non-complicé ou sévère, suivent les recommandations éditées par l'OMS. Ces recommandations permettent à la fois le recul de la mortalité et de la morbidité dues au paludisme, mais aussi d'empêcher le développement de nouvelles résistances aux traitements actuels. De plus, l'élimination de la parasitémie chez le patient, grâce à des traitements efficaces, permet de réduire la transmission du parasite. Les objectifs des traitements varient selon les formes de paludisme.(54)

II.1.5.3.3.2.1.1. Paludismes non compliqués

L'objectif des traitements administrés lors d'un paludisme non compliqué, est de soigner le patient le plus rapidement possible pour éviter l'évolution de la maladie.(54) Les effets indésirables du traitement employé ainsi que la vitesse de la réponse thérapeutique seront pris en considération pour choisir le traitement approprié.

II.1.5.3.3.2.1.2. Paludismes graves

L'objectif principal du traitement antipaludique dans le cas de paludisme grave est de prévenir la mort du patient.(54)

Dans le cas d'un paludisme cérébral, la prévention de déficit neurologique est l'objectif le plus important.

Dans le traitement du paludisme grave pendant la grossesse, le principal objectif est de sauver la vie de la mère.

Dans tous les cas de paludisme grave, la prévention de la recrudescence et les effets indésirables mineurs sont considérés comme secondaires.

II.1.5.3.3.2.2. Traitements du paludisme non-complicé dû à *P. falciparum*

Dans le cas de paludisme non-complicé dû à *P. falciparum*, l'OMS recommande l'association de deux ou plusieurs médicaments schizontocides ayant des modes d'action indépendants. Ces associations permettent souvent une meilleure efficacité et préviennent l'apparition de résistances. En effet, dans le cas où le parasite serait résistant à l'un des médicaments, la lyse du parasite sera engendrée par l'autre médicament antipaludique. Pour

augmenter les chances de succès du traitement, les médicaments partenaires doivent être suffisamment indépendants et être complémentaires.

II.1.5.3.3.2.1. Traitements par combinaison, du paludisme non-complicé dû à *P. falciparum*

Les traitements par combinaison étaient généralement composés des mélanges : sulfadoxine-pyriméthamine, chloroquine-sulfadoxine-pyriméthamine ou l'amodiaquine-sulfadoxine-pyriméthamine.

Néanmoins, des niveaux élevés de résistance à ces médicaments en monothérapie ont été enregistrés et compromettent leur efficacité, même en combinaison.

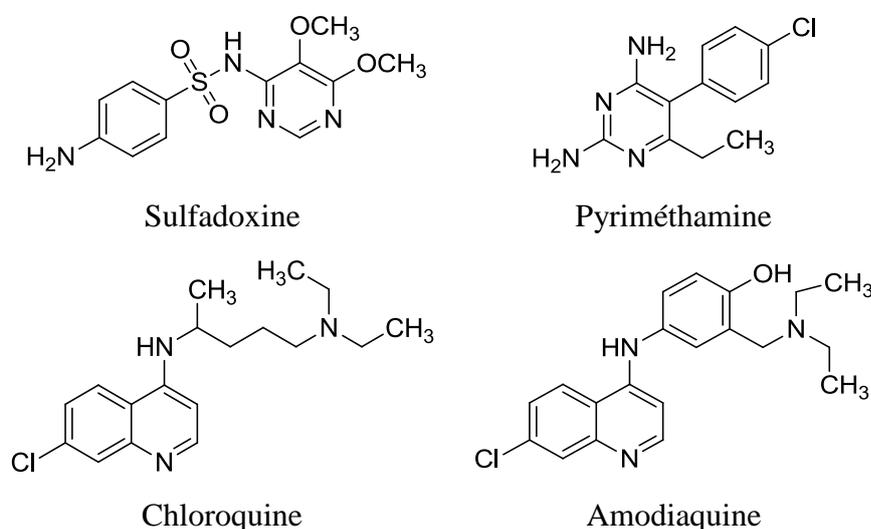
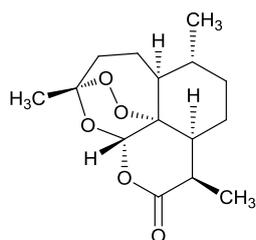


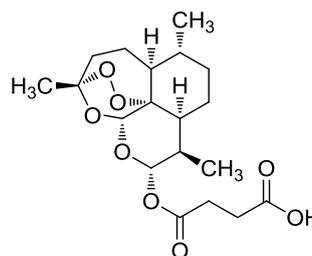
Figure 8 : Structures chimiques de la sulfadoxine, de la pyriméthamine, de la chloroquine et de l'amodiaquine.

II.1.5.3.3.2.2. Traitements du paludisme non-complicé par des combinaisons avec des ACTs

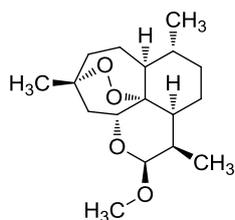
Les ACT sont des combinaisons dans lesquelles l'un des composants est soit l'artémisinine, soit l'un de ses dérivés, par exemple l'artésunate, l'artéméther (Figure 9) ou la dihydroartémisinine (Figure 9).



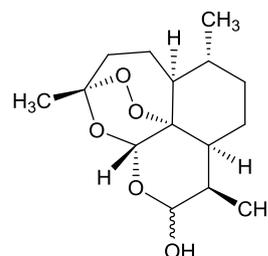
Artémisinine



Artésunate



Artéméther

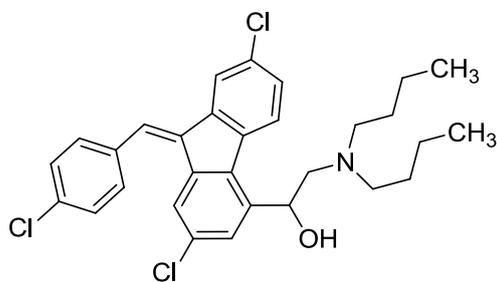


Dihydroartémisinine

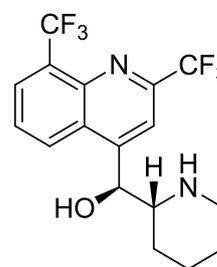
Figure 9 : Structures chimiques de l'artémisinine, de l'artésunate, de l'artéméther et de la dihydroartémisinine.

Les dérivés de l'artémisinine engendrent une baisse rapide de la parasitémie et la disparition rapide des symptômes. L'artémisinine et ses dérivés sont connus pour être éliminés rapidement, c'est pourquoi ils doivent être administrés sur une période de trois jours s'ils sont associés à d'autres médicaments à élimination lente ou sur une période de sept jours s'ils sont associés à d'autres médicaments à élimination rapide.

Les combinaisons désormais recommandées dans le traitement du paludisme non-complicé sont artéméther-luméfantine, artésunate-amodiaquine, artésunate-méfloquine, artésunate-sulfadoxine-pyriméthamine et dihydroartémisinine-pipéraquine.



Luméfantine



Méfloquine

Figure 10 : Structures chimiques de la luméfantine et de la méfloquine.

II.1.5.3.3.2.3. Traitements du paludisme grave dû à *P. falciparum*

Dans le cas du paludisme grave, le traitement antipaludique doit être administré rapidement soit par voie parentérale, soit par voie rectale. Pour la voie parentérale, deux classes de médicaments sont disponibles : les alcaloïdes du quinquina (quinine et la quinidine) et les dérivés de l'artémisinine (artésunate, artéméther). En raison de graves problèmes de résistance, la chloroquine n'est plus recommandée pour le traitement du paludisme sévère. D'autre part, l'association sulfadoxine-pyriméthamine est également déconseillée par injection intraveineuse.

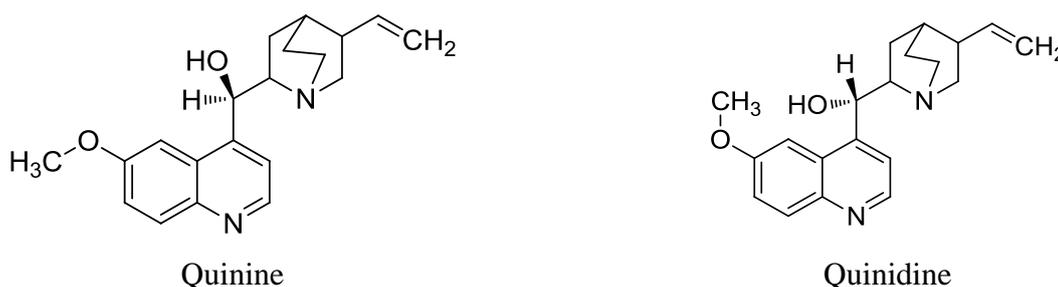


Figure 11 : Structures chimiques de la quinine et de la quinidine.

Si l'injection des différents types de traitement est impossible, la voie rectale sera préférée. Dans le cas d'un traitement par voie rectale, des suppositoires d'artémisinine ou d'artésunate seront utilisés.

II.1.5.3.3.2.4. Traitements du paludisme dû à *P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae*

Dans les cas de paludisme dû à *P. vivax*, un traitement à la chloroquine peut être envisagé si la zone géographique correspond à la présence de parasites sensibles à cette molécule. Dans le cas contraire, un traitement comprenant des ACTs devra être donné. L'OMS recommande des combinaisons comprenant de la pipéraquline, de la méfloquine ou de l'amodiaquine en association avec un dérivé de l'artémisinine (de l'artésunate ou de la dihydroartémisinine).

D'autre part, dans le cas d'une rechute à *P. vivax*, l'OMS recommande l'ajout de la primaquine dans le traitement, durant 14 jours.

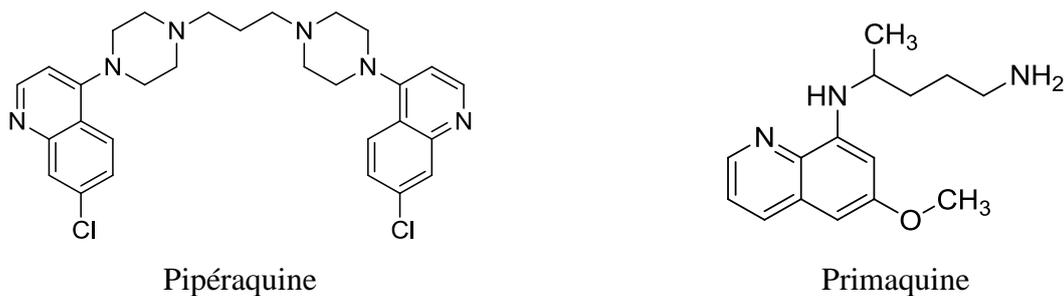


Figure 12 : Structures chimiques de la pipéraquline et de la primaquine.

Dans les cas de paludisme dû à *P. ovale*, l'OMS recommande l'association chloroquine-primaquine.

Dans le cas de paludisme dû à *P. malariae*, l'OMS recommande l'utilisation de la chloroquine.

II.1.5.3.3.2.5. Traitements du paludisme dû à *P. knowlesi*

Dans les cas de paludisme dû à *P. knowlesi*, aucune recommandation n'a été faite au niveau de l'OMS.(54) Néanmoins, différentes études montrent que l'association chloroquine-primaquine(102, 103), l'association artéméther-luméfantine(104) ou la quinine(104) sont efficaces dans le traitement du paludisme non-complicé dû à *P. knowlesi*. Pour les cas de paludisme sévère, un traitement parentéral de quinine semble indiqué.(104)

II.1.5.3.3.2.6. Suivi des traitements actuels

Les résistances ou les baisses de sensibilité du parasite du paludisme envers les médicaments antipaludiques actuels, font l'objet d'une surveillance accrue de la part des organismes de santé publique. En 2001, l'artémisinine était considérée comme le « plus grand espoir contre le paludisme », néanmoins, plus de dix ans après, l'apparition de résistances et les baisses de sensibilité aux ACTs posent des problèmes et menacent l'efficacité des traitements. C'est pourquoi, le développement de nouvelles molécules est essentiel pour créer un nouvel arsenal thérapeutique.

II.1.5.3. 4. Les médicaments en développement

Actuellement, de nouvelles entités chimiques ou combinaisons sont en développement clinique. Le portefeuille actuel est détaillé ci-dessous, en fonction du stade de développement des molécules en devenir.

II.1.5.3. 4.1. Les médicaments au stade préclinique

Durant cette phase, les profils toxicologique et pharmacologique du médicament sont étudiés, via des tests *in silico*, *in vitro* et sur modèle animal.

- RKA182(105) est un tétraoxane qui a été développé par l'équipe du Professeur O'Neill à l'Université de Liverpool. Ces tétraoxanes ont l'avantage d'être des molécules achirales, ce qui pourrait conduire à des coûts de développement faibles.

- La trioxaquine(106) (PA1103) est une molécule bimodale qui comporte une partie aminoquinoléine et une partie trioxane. Cette molécule a été développée par l'équipe du Professeur Meunier à Toulouse, dans le cadre du projet PALUMED. En 2007, la trioxaquine est entrée en phase préclinique en collaboration avec Sanofi.

- BCX4549, également appelée DADMe-Immucillin-G, a été développée à l'Université Yeshiva de New-York. Cette molécule est actuellement en phase préclinique. D'autre part, des tests *in vivo* chez des singes *Douroucoulis* ont permis de montrer qu'un traitement *per os* de BCX4549 permet la guérison totale de ces singes infectés par *P. falciparum*. (107)

- DSM265(108, 109) a été développée grâce à la collaboration de trois groupes, les groupes du Prof. Margaret Philips de l'Université du Texas, du Prof. Pradip Rathod de l'Université de Washington, et du Prof. Sue Charman de l'Université de Monash. La molécule est actuellement en développement préclinique, et les résultats préliminaires laissent envisager le début de la phase I en 2013.⁹⁶

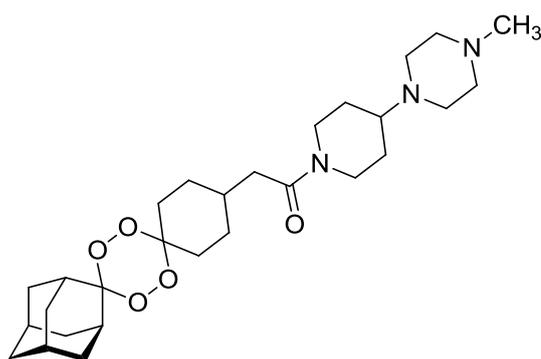
- MK-4815(110) est actuellement en développement préclinique et est développée par Merck et MMV. En 2008, Merck avait signé un accord avec MMV pour la mise sous licence des droits de la molécule et le début de la phase I. Cependant, une étude préclinique complémentaire a été démarrée afin d'approfondir le profil de sécurité de la molécule avant toute administration chez l'Homme.(111)

- P218(112)(113) a été développée dans le cadre d'un projet de recherche sur les antipaludiques inhibant la voie des folates. En effet, les classes thérapeutiques ciblant cette voie connaissent l'apparition de nombreuses résistances. MMV a donc développé un programme pour tenter de trouver un médicament efficace contre les souches résistantes. Les tests préliminaires effectués sur P218 ont permis de montrer que cette molécule possède un bon index thérapeutique et peu de

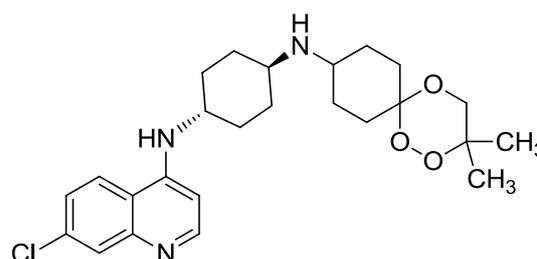
toxicité chez l'animal. La phase préclinique est en cours et permettra d'établir la dose efficace pour les études chez l'Homme.

- Genz-668764(114) est un aminoindole développé par Genzyme Corporation, une filiale de Sanofi. Après un screening de 70000 molécules à l'Institut Broad, la molécule Genz-644442 a été identifiée comme « hit ». Après étude des résultats préliminaires et des relations structure-activité, la société Genzyme Corporation a ensuite optimisé la structure pour conduire à Genz-668764 qui est actuellement en phase préclinique.

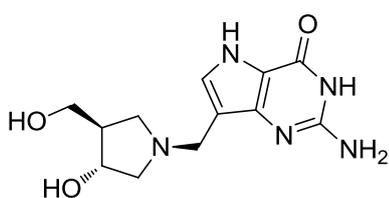
- NPC-1161B(115) est une amino-8-quinoléine qui est développée grâce à un partenariat entre MMV et l'Université du Mississippi. NPC-1161B est l'un des énantiomère du mélange racémique de NPC-1161C. Cet énantiomère s'est avéré être le moins toxique et le plus efficace sur modèle murin. NPC-1161B est actuellement en phase préclinique et devrait intervenir dans le traitement du paludisme dû à *P. vivax*.(116)



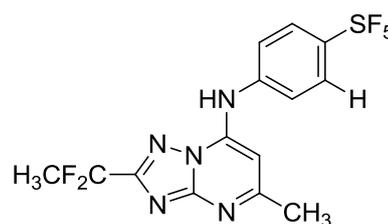
RKA 182



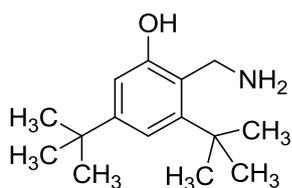
Trioxaquine



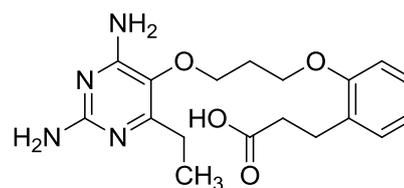
BCX4945



DSM265



MK4815



P218

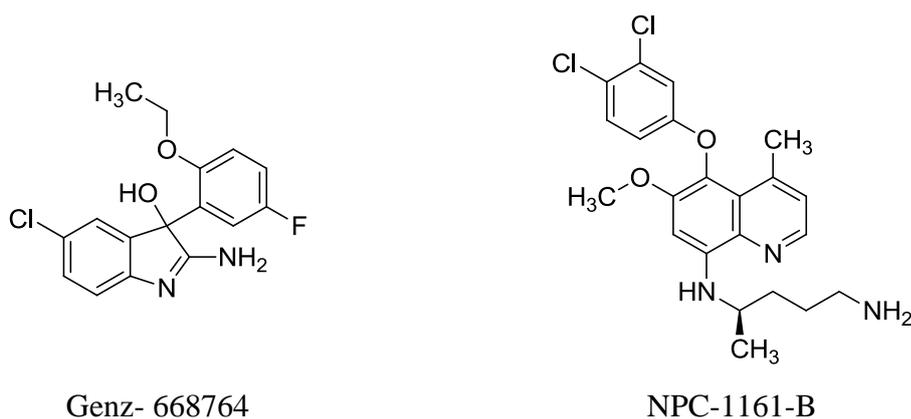


Figure 13 : Médicaments en développement préclinique

II.1.5.3. 4.2. Les médicaments en phase I

C'est lors de la phase I que le médicament va être administré chez l'Homme pour la première fois. Ces tests sont effectués sur un petit groupe de volontaires sains (entre 20 et 80) afin de définir le dosage approprié et d'identifier les effets secondaires.

- GNF156(113) est une imidazolopipérazine développée par MMV et Novartis. La phase préclinique a démontré une bonne activité sur les formes sanguines, hépatiques et sur les gamétocytes de *Plasmodium*. GNF156 est entrée récemment en phase I.(117)(118)

-La sévuparine de sodium est un analogue de l'héparine possédant une basse masse moléculaire (7,4 kDa). La sévuparine de sodium, ne présente pas l'effet anticoagulant important que l'on retrouve pour les dérivés d'héparine. Cette molécule est testée comme adjuvant du mélange atovaquone/proguanil. La phase I des essais cliniques, a débuté en mai 2009 et s'est terminée en septembre 2009. La molécule présente un bon profil toxicologique. La phase I/II est en cours de recrutement de patients.(119)

-AQ13 a été développée par l'équipe du Professeur Krogstad à l'Université de Tulane en Louisiane. AQ13 a été testée en association avec la chloroquine sur des patients adultes âgés de 21 à 45 ans. La phase I a été terminée en 2006 et a montré que l'association AQ13/CQ n'engendre pas de problèmes de toxicité rénale, hépatique, hématologique ou sur d'autres organes vitaux.(120)

- GSK369796 est une amino-4-quinoléine développée par un partenariat entre l'équipe du Professeur O'Neill à l'Université de Liverpool, MMV et GSK. Cette molécule s'est révélée très

active *in vitro* sur des souches CQ-sensibles et CQ-résistants de *P. falciparum* et *in vivo* chez les rongeurs. Durant la phase I, GSK369796 a été administrée seule, à différents dosages (jusqu'à 2 mg) chez des patients sains. Une exposition plasmatique plus basse que prévue et des effets indésirables aux plus hautes doses, ont conduit les experts à interrompre le programme.(121, 122)

- CDRI 97-78(123) est un 1,2,4-trioxane développé par l'Institut Central de Recherche de Médicaments Indiens (CDRI). La phase I de cette molécule a débuté en 2008 en collaboration avec les laboratoires Ipca.(123)

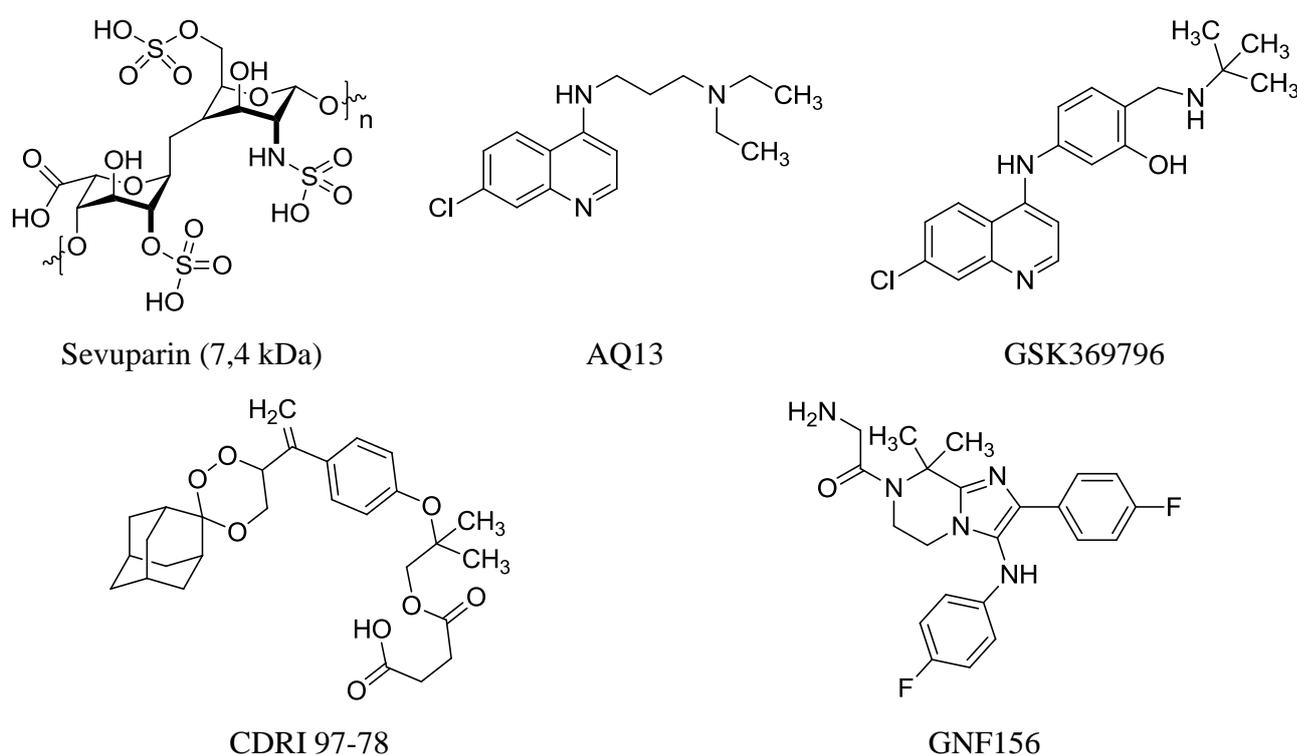


Figure 14 : Médicaments au stade préclinique

II.1.5.3.4.3. Les médicaments en phase IIa

Durant la phase IIa, des tests vont être effectués sur un nombre limité de malades (entre 100 et 200) afin de démontrer l'efficacité du médicament.

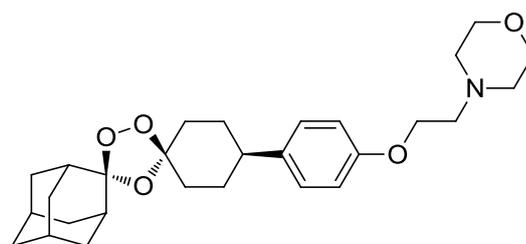
- NIDT609(124) est une spiroindolone développée par MMV et Novartis. La phase clinique, débutée en 2010, a permis de montrer que ses propriétés pharmacocinétiques sont favorables à un dosage oral journalier (une seule dose) et que cette molécule est curative dans le cas de souris infectées par une souche de *P. berghei* très virulente. La phase I a permis de montrer l'innocuité de la molécule envers les Hommes. La phase IIa est en cours.(125)

- OZ439 est un trioxane synthétique développé grâce à un partenariat entre MMV et les Universités du Nebraska, de Monash et de l'Institut des maladies tropicales et de santé publique Suisse. Durant les tests précliniques et les tests de phase I, cette molécule s'est avérée avoir une exposition plasmatique accrue comparativement à l'artémisinine. Il est à noter que OZ439 s'est révélée curative à une mono-dose de 20mg/kg chez la souris infectée par *P. berghei*.(126) D'autre part, même à haute dose, la molécule est très bien tolérée par les patients sains. Depuis 2010, la phase II a été initiée, OZ439 est administrée seule, néanmoins, trois combinaisons potentielles ont été sélectionnées pour des tests futurs. (127, 128)

- La fosmidomycine est développée grâce à un partenariat entre MMV et Jomaa Pharma. La fosmidomycine est un antibiotique naturel produit par *Streptomyces lavendulae*, qui a été initialement utilisé comme agent antibactérien. Les chercheurs de Jomaa Pharma ont ensuite démontré que cette molécule agit comme inhibiteur de la voie des isoprénoïdes en bloquant une voie métabolique dont le parasite du paludisme est dépendant. Actuellement, la fosmidomycine est actuellement en phase II de développement clinique, en association avec la clindamycine, un autre antibiotique. (129–134)

- La bleu de méthylène est un colorant, qui a été développé comme molécule antipaludique par DSM (Dutch state mines) et l'Université d'Heidelberg. Le bleu de méthylène est actuellement en phase II de développement clinique, en association avec un mélange d'artésunate/amodiaquine(122, 135–138)

- SAR97276 est un analogue de la choline, qui a été découvert par l'Université de Montpellier et développé par la Sanofi. La molécule était en phase II d'essai clinique jusqu'en juin 2010 sur des patients atteints de paludisme grave et jusqu'en février 2012 sur des patients atteints de paludisme non compliqué. Selon les critères prédéfinis et les recommandations des comités de suivi des données, les deux études ont été stoppées faute d'efficacité suffisante. (139, 140)



OZ439

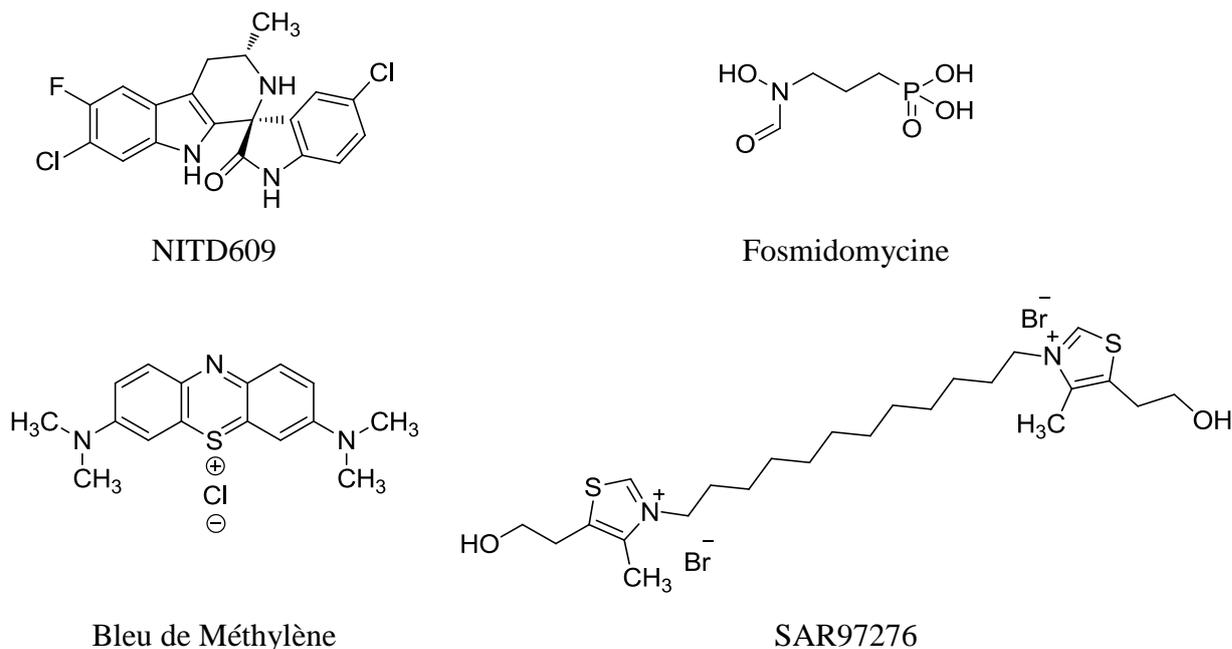


Figure 15 : Médicaments en phase IIa.

II.1.5.3.3.4. Les médicaments en phase IIb et III

La dose thérapeutique du médicament va être déterminée durant la phase IIb, qui est réalisée sur un plus grand nombre de malades (entre 100 et 300). La phase III est réalisée sur un nombre important de malade (1000 ou plus) et sert à mesurer l'efficacité du médicament à la dose préalablement déterminée (phase IIb) par rapport à un traitement de référence.

- La ferroquine est une amino-4-quinoléine ferrocénique développée par l'Université Lille 1 en collaboration avec la société Sanofi. Cette molécule s'est révélée très active sur les souches CQ-sensibles et CQ-résistantes de *P. falciparum*. Cette molécule était en phase IIb en association avec l'artésunate, pour le traitement du paludisme non compliqué dû à *P. falciparum* ou *P. vivax*, jusqu'en juin 2011. L'interruption de cette phase n'est pas en relation avec des effets indésirables ou une activité inattendue, mais découle d'une réorientation de stratégie de Sanofi dans le développement de cette molécule.(141)

- Le Pyramax® pédiatrique est une combinaison fixe d'artésunate et de pyronaridine. Cette molécule est utilisée dans les cas de paludisme non compliqué dû à *P. falciparum* et pour le stade sanguin de *P. vivax*. La formulation de ce médicament a été réalisée sous forme de granulés afin de faciliter l'administration chez les nourrissons. Une étude de phase III a été effectuée pour évaluer l'efficacité, l'innocuité et la tolérabilité du Pyramax® sous forme de granulés. Les résultats de cette

étude ont permis de montrer que le médicament est bien toléré et est facilement administré. Un dossier devrait être soumis rapidement à l'agence européenne des médicaments (EMA).(142–145)

- L'azithromycine est actuellement en phase III de développement clinique avec MMV et Pfizer. L'azithromycine est testée en association avec la chloroquine, sous le nom Zithromax®, dans le traitement préventif intermittent chez les femmes enceintes.(146–151)

- La tafénoquine est une amino-8-quinoléine qui est développée par MMV et GSK. Cette molécule est testée en association avec la chloroquine. Les amino-8-quinoléines, comme la primaquine, engendrent des problèmes d'hémolyse chez les patients déficients en G6PD. C'est pourquoi, des tests de phase I pour l'évaluation du potentiel d'hémolyse de la tafénoquine sont actuellement en cours de recrutement. D'autre part, la tafénoquine est testée en association avec la chloroquine, en phase II, pour le traitement radical du paludisme dû à *P. vivax*. (93, 152–155)

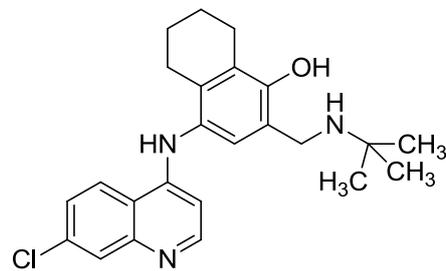
- *Argemone mexicana* est une plante herbacée de la famille des papavéracées. Cette plante est connue en médecine traditionnelle et a montré une activité antipaludique sur *P. falciparum*. Des essais cliniques randomisés ont été conduits par Antenna, sur des décoctions d'argémone. La première étude a permis de montrer qu'un traitement à base d'argémone présente les mêmes résultats qu'un traitement classique à base d'artémisinine. D'autre part, des recherches seront menées pour tenter d'extraire et d'identifier le principe actif contenu dans cette plante.(156, 157)

- Artimist® est un traitement spray sublingual d'artéméther, spécialement conçu pour le traitement du paludisme sévère chez les enfants, dû à *P. falciparum*. La phase II est actuellement en cours de recrutement de patient. (158)

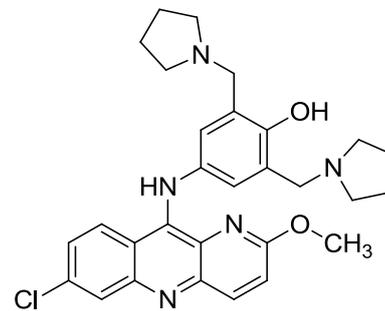
-Le cotrimoxazole est une association de triméthoprime et de sulfaméthoxazole, deux antibiotiques bactériostatiques. Le cotrimoxazole est recommandé par l'OMS dans le traitement prophylactique du paludisme chez les enfants de moins de six semaines ou nourris par allaitement, issus de mère porteuse du Sida. Une phase III d'essais cliniques est en cours de recrutement de patients (enfants âgés de 4 à 5 mois). D'autre part, une phase IV d'essais cliniques chez les adultes porteurs du sida a été achevée.(159–161)

-L'érythropoïétine, plus connu sous le nom d'EPO, est une hormone de nature glycoprotéique. L'EPO est actuellement en phase III d'essai clinique, en association avec la quinine.(162) Elle est testée comme adjuvant dans le traitement du paludisme sévère chez l'enfant. Des premières données

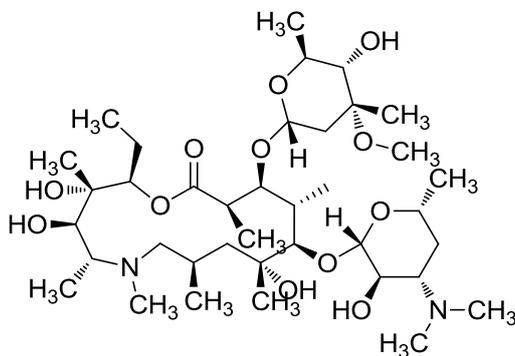
ont permis de montrer l'inocuité à court terme (sept jours) de l'érythroïéine à des doses élevées.(163)



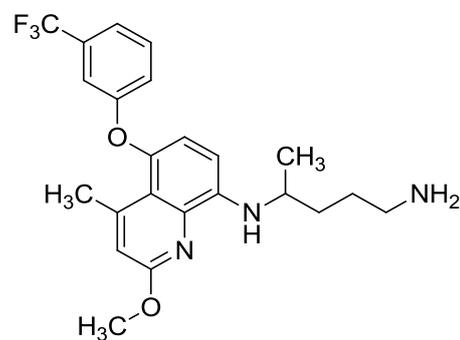
Naphthoquine



Pyronaridine



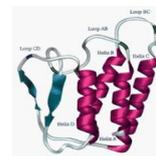
Azithromycine



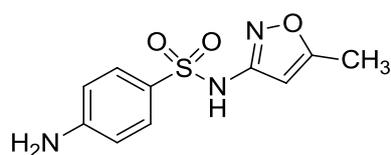
Tafénoquine



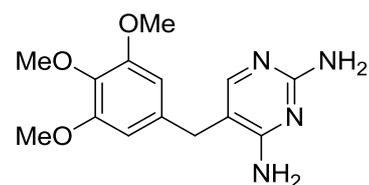
Argemone mexicana



Erythropoïéine(164)

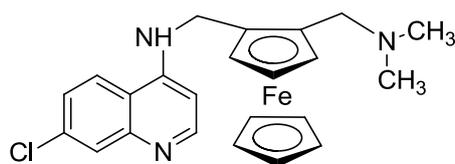


Sulfaméthoxazole



Triméthoprime

Co-trimoxazole®



Ferroquine

Artéméter en spray sublinguale

Artimist™

Figure 16 : Médicaments en phase IIb et III

II.1.5.3.4.5. Les médicaments en cours d'enregistrement

Dès sa constitution, le dossier d'enregistrement sera soumis aux autorités de santé qui évalueront le médicament et permettront ou non son autorisation de mise sur le marché.

-Récemment (février 2012), le comité pour les produits utilisés en médecine humaine a adopté une opinion positive pour l'utilisation du Pyramax (association de la pyronaridine avec l'artésunate) dans le cadre du traitement du paludisme non compliqué dû à *P. falciparum* ou *P. vivax*, chez l'adulte ou l'enfant de plus de 20 kilogrammes.(142)

-Le médicament ASMQ, développé par DNDi, est une association d'artésunate et de méfloquine. L'intérêt de ce médicament est qu'il est formulé sous la forme d'un seul comprimé et permettra d'éviter les problèmes de mauvaise observance. Ce médicament a été autorisé au Brésil en 2008, en Inde en 2011. Des demandes d'autorisation ont été soumises pour d'autres pays d'Amérique latine et d'Asie du sud.(165)

-La formulation intrarectale de l'artésunate est développée par l'OMS. Les résultats d'une étude clinique randomisée de grande envergure ont été publiés en 2009. Suite aux résultats de cette étude, le comité consultatif des médicaments anti-infectieux a étudié la demande d'autorisation de mise sur le marché de l'OMS. Le rapport bénéfice / risque a été considéré comme négatif par le comité.(166)

II.1.5.3.4.6. Les médicaments en phase IV

Les médicaments en phase IV ont reçus une autorisation de mise sur le marché et donc peuvent être commercialisés. La phase IV permet de dépister les effets secondaires rares ou les complications tardives, grâce à un suivi continu du médicament.

-L'artésunate injectable (en intraveineuse ou en intramusculaire) est recommandée dans le traitement de première ligne du paludisme grave. La formulation injectable est importante puisque dans les cas de paludisme grave, traiter les patients par voie orale est souvent impossible (inconscience, vomissements...).(167)

-En 2011, suite à l'avis positif formulé par l'EMA, la Commission Européenne a délivré une autorisation de commercialisation pour Eurartesim®, une combinaison à dose fixe de dihydroartémisinine et de pipéraquline. Ce médicament est développé par Sigma-Tau en partenariat avec MMV pour le traitement du paludisme non compliqué dû à *P. falciparum*.(168)

-Sanofi, DNDi et MMV se sont associés pour évaluer le profil de sécurité du médicament ASAQ (artésunate/amodiaquine), utilisé en traitement de première ligne. Cette phase IV se déroulera dans le district sanitaire d'Agboville, en Côte d'Ivoire, pour une durée de 2 à 3 ans.(169)

-Coartem® est un traitement qui a été développé spécialement pour les enfants par MMV et Novartis. Il s'agit d'une combinaison fixe d'artéméther et de luméfántrine pour le traitement du paludisme non compliqué dû *P. falciparum*. Coartem® a été approuvé par Swissmedic (l'Agence de réglementation suisse) en Décembre 2008 et a reçu une préqualification de l'OMS en Février 2009. En Avril 2009, l'OMS l'a placé sur la liste des médicaments essentiels pour les enfants. En Février 2012, 100 millions de traitements de Coartem® avaient été livrés dans 39 pays.(170)

II.1.5.3.4.7. Approches dans le développement de nouvelles molécules

Des approches de criblage à haut débit sont de plus en plus utilisées pour trouver de nouvelles molécules d'intérêt. La firme pharmaceutique GSK a récemment publié une étude portant sur plus de 2 millions de composés dont 13500 environ, ont révélé une activité.(171)

Les molécules en développement sont souvent issues d'un travail de pharcomodulation de molécules déjà utilisées. Néanmoins, les nouvelles molécules créées possèdent des modes d'action proches mais pas forcément identiques à ceux de la molécule parente.

D'autre part, les thérapeutiques utilisées dans d'autres pathologies peuvent également trouver une utilité dans le traitement du Paludisme. La fosmidomycine en est un bon exemple puisqu'il s'agit d'un antibiotique.

II.1.5.3.4.8. Approches vaccinales

Le développement d'un vaccin efficace contre le paludisme est rendu difficile par la complexité du parasite. De nombreuses approches vaccinales ont été étudiées durant les dernières décennies, malheureusement aucun vaccin n'est encore disponible sur le marché. Actuellement, le candidat vaccin le plus avancé contre l'espèce la plus létale du paludisme humain, *P. falciparum*, est RTS, S/AS01. Le candidat vaccin RTS,S/AS01 est développé par GSK et est actuellement en phase III d'essai clinique. L'étude porte sur onze sites d'essais dans sept pays Africains. Le recrutement des patients a été terminé en janvier 2011 et a permis de rassembler environ 15500 participants. Les résultats d'une première étude de phase III à grande échelle montrent que le candidat vaccin permet de protéger significativement les jeunes enfants du paludisme simple et du

paludisme sévère, avec un taux de protection de 50%. Le profil de tolérabilité et de sécurité semble acceptable. La fin de l'étude est prévue pour 2014 et permettra d'évaluer la durée de protection induite par le candidat vaccin et également de déterminer son efficacité chez les plus jeunes enfants.(172)

II.1.5.4. Les cibles thérapeutiques

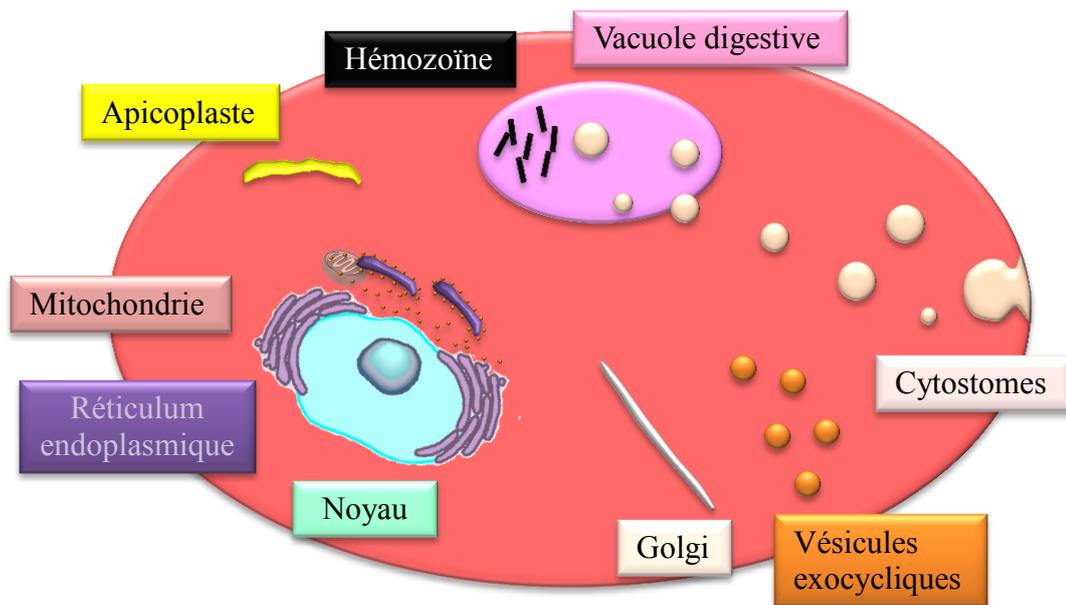


Figure 17 : Cibles potentielles identifiées chez *P. falciparum*

Durant les dernières décennies, de nombreuses avancées ont été réalisées dans la compréhension des mécanismes moléculaires de survie du parasite dans l'organisme et en particulier dans l'hématie de l'hôte. En effet, c'est au niveau du stade sanguin que le métabolisme du parasite est le plus important, c'est aussi à ce stade que les premiers symptômes apparaissent. L'étude des autres stades du cycle de vie du parasite (comme les hépatocytes) sont plus difficiles à étudier.

Durant ce travail nous nous sommes intéressés aux cibles présentes au stade sanguin du parasite, particulièrement à l'apicoplaste et à la vacuole digestive.

II.1.5.4.1. La vacuole digestive

II.1.5.4.1.1. Généralités

La survie des *Plasmodium* dépend de l'ingestion de macromolécules solubles, du fait de leur incapacité à ingérer des nutriments. Les anneaux se nourrissent par micropinocytose(173), c'est-à-dire qu'ils absorbent de petits fragments de cytoplasme érythrocytaire. Lorsque le phénomène de micropinocytose s'arrête et que le parasite est devenu un trophozoïte mûr, le système cytotomal devient alors fonctionnel. Le cytostome est formé par invagination de la membrane du parasite et de la vacuole parasitophore. Cette structure est composée d'une double membrane et est de forme tubulaire. Un bourgeonnement de grosses vésicules se produit sur la partie distale du cytostome et engendre la formation de vacuoles digestives.(173) Les enzymes protéolytiques contenues dans la vacuole digestive permettent la digestion de l'hémoglobine, principale source d'acides aminés du parasite.(174, 175) La vacuole digestive, qui était à l'origine à double membrane, se transforme en vacuole à simple membrane permettant ainsi une diffusion plus efficace des produits nutritifs dans le cytoplasme du parasite. La vacuole digestive ainsi créée est un compartiment acide dans lequel le pH est compris entre 5,2 et 5,6.(74)

II.1.5.4.1.2. Digestion de l'hémoglobine

Lors de la phase intra-érythrocytaire, le parasite se développe à l'intérieur d'une vacuole parasitophore, formée lors de l'étape d'invasion. Le parasite a donc besoin d'espace pour pouvoir croître et se diviser.(176) Son développement nécessite également un apport en nutriments, notamment des acides aminés.(174, 175) Pour ce faire, le parasite digère sa cellule hôte de l'intérieur, consommant environ 75% de l'hémoglobine(177-179), constituant majeur des érythrocytes. De plus, la dégradation de l'hémoglobine permet également de maintenir la pression osmotique afin d'éviter la lyse prématurée du globule rouge infecté.(176, 180) Une métalloprotéase (falcilysine), quatre protéases aspartiques (falcipaïnes), une dipeptidylpeptidase I, trois protéases cystéiques (plasmepsines), et probablement des aminopeptidases sont impliquées dans la digestion de l'hémoglobine.(181) L'hémoglobine est ensuite clivée en fragments plus petits par les falcipaïnes et les plasmepsines. Ces fragments sont ensuite hydrolysés par la falcilysine en petits peptides et enfin libérés par la dipeptidylpeptidase I et les aminopeptidases. Des études, *in vitro* et *in vivo*, ont montré que des inhibiteurs de falcipaïne et de plasmepsine sont capables de dégrader ou de tuer le parasite ; néanmoins leur spécificité n'est pas suffisante.(175) Des expériences de knock-out sur plusieurs de ces enzymes, individuellement ou en association, ont démontrées que *P. falciparum* croît normalement, ou présente de faibles altérations. Ceci suggère que ces différentes enzymes se

compensent mais leur rôle reste flou. Pour ces raisons, elles ne représenteraient pas de bonnes cibles médicamenteuses.(175)

II.1.5.4.1.3. Détoxification de l'hème

Lors du processus de dégradation de l'hémoglobine, de l'hème est libérée. Cette hème libre est extrêmement toxique pour le parasite. En effet, l'hème est capable d'inactiver les enzymes présentes chez le parasite, telles que les plasmepsines, les falcipaines(182), la glyceraldehyde-3-phosphate déhydrogénase(183), enzyme clé de la voie de glycolyse donc de la production d'énergie qui interviendrait également dans la formation du complexe apical et la 6-phosphogluconate déhydrogénase(184, 185), enzyme clé de la voie des pentoses phosphates.(186)

L'hème libre induit un phénomène d'hémolyse(187). D'autre part, l'hème libre engendre également une instabilité membranaire du globule rouge, par induction d'une réticulation des protéines du cytosquelette de celui-ci.(188) Lors de sa dégradation dans la vacuole digestive (Figure 18), l'atome de Fe^{II} contenu dans l'hémoglobine (Hb) est oxydé en Fe^{III} pour former la méthémoglobine (metHb), probablement par auto-oxydation au contact de l'oxygène. Lors de cette oxydation, les électrons libérés vont engendrer la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans la vacuole digestive(189) et causer un stress oxydant au parasite.(190) De plus, les ROS produits peuvent induire une peroxydation lipidique, aux conséquences désastreuses pour le parasite.(190)

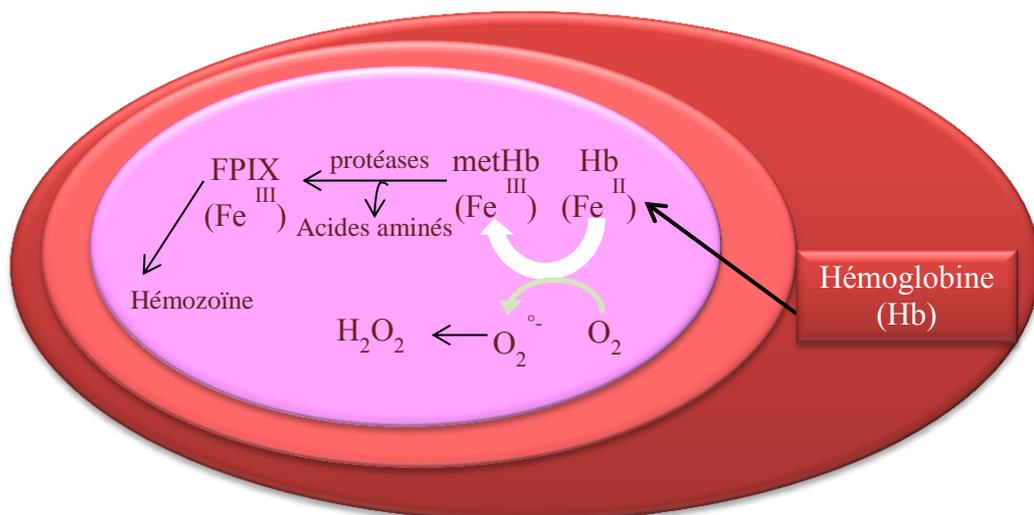


Figure 18 : Digestion de l'hémoglobine chez *P. falciparum*

Contrairement à l'Homme, le parasite est dépourvu d'hème oxygénase nécessaire à la dégradation enzymatique de l'hème.(191) Chez *P. falciparum*, l'hème (Fe(II)) est oxydée en ferriprotoporphyrine IX (FPIX) appelée également hématine (Fe(III)), puis incorporée dans un microcristal : l'hémozoïne, ou encore pigment malarique.(192) La formation de ce pigment permet la détoxification du parasite.(173) La dégradation de l'hémoglobine et la production d'hémozoïne représentent un intérêt thérapeutique crucial puisqu'elles sont la cible d'un certain nombre de médicaments antipaludiques(193–195).

II.1.5.4.1.4. Formation de l'hémozoïne

Le mécanisme de formation de l'hémozoïne est le sujet de débats scientifiques depuis de nombreuses années. Bien qu'il soit admis qu'environ 95% de l'hème présente dans le parasite soit convertie en hémozoïne(196), le mécanisme précis de sa formation reste encore non résolu. Dans les années 90, il a été suggéré que la formation de l'hémozoïne était catalysée par une enzyme : l'hème polymérase.(197) Plus tard, cette hypothèse a été réfutée en proposant un phénomène auto-catalytique comme le mécanisme de formation de l'hémozoïne.(198)

Il a ensuite été suggéré que les protéines riches en histidine (HRP) intervenaient dans la formation de l'hémozoïne.(199, 200) Il a été montré que les deux protéines HRP II et HRP III pourraient être à l'origine de la formation de l'hémozoïne. HRP II contiendrait 51 répétitions du tripeptide His-His-Ala, représentant ainsi 76% de la protéine mature. HRP III contiendrait 27 répétitions du dipeptide His-His, impliquées dans des tripeptides His-His-Ala ou His-His-Asp. De plus des expériences de marquage immunofluorescent ont permis de montrer que HRP II n'est présente qu'en faible quantité dans la vacuole digestive de *P. falciparum*. Alors qu'une proportion importante de cette protéine est située dans le cytoplasme du parasite ou dans le globule rouge, HRP II pourrait être transportée dans la vacuole digestive. Cependant, un suivi cinétique de la formation de l'hémozoïne a permis de montrer que HRP II ne convertirait qu'environ 30% de l'hème en hémozoïne au bout de 24h. D'autre part, des clones de *P. falciparum* délétés en HRP II et HRP III, produisent de l'hémozoïne normalement.(199) D'autres HRP ont été détectées dans le parasite, pouvant ainsi compenser la perte des HRP II et III. Toutefois, aucune protéine homologue aux HRP n'a été identifiée chez *P. vivax* et *P. berghei*. Toutes ces études laissent supposer que les HRP ne seraient pas impliquées dans le mécanisme de formation de l'hémozoïne.

L'analyse lipidomique de la membrane de la vacuole digestive n'a pas été réalisée, c'est pourquoi la composition de cette membrane n'est pas connue avec précision. Néanmoins,

récemment, il a été montré que le phosphatidylinositol 3-monophosphate, un phospholipide impliqué dans le trafic protéique, est présent dans la membrane de la vacuole digestive.(201) D'autre part, plus récemment, il a été suggéré que des lipides spécifiques du parasite seraient impliqués dans la formation de l'hémozoïne. En effet, il a été suggéré que les lipides de type mono (MAG) et diacylglycérol (DAG) pourraient promouvoir la formation de l'hémozoïne alors que les triacylglycérols (TAG) n'en seraient pas capables.(202) Néanmoins, des corps lipidiques contenant du TAG ont été découverts à l'intérieur de *P. falciparum*.(203) De plus, une enzyme responsable de la synthèse du TAG serait essentielle à la prolifération intra-érythrocytaire du parasite.(204) D'autre part, les corps lipidiques neutres seraient associés à la vacuole digestive et seraient largement constitués de DAG et de TAG.(205) En 2005, une étude de microscopie électronique à transmission a permis de montrer que les cristaux d'hémozoïne seraient enveloppés de corps lipidiques neutres.(206) La composition de ces corps lipidiques et leur capacité à promouvoir la formation d'hémozoïne ont été étudiées.(207) Dans cette étude, l'hémozoïne a été observée à l'intérieur de nanosphères lipidiques. Après isolation, il a été montré que le constituant majeur de ces nanosphères seraient le MAG et en moindre mesure, le DAG et le TAG. Ces nanosphères lipidiques ne seraient pas associées à des protéines (notamment HRP II). Ces données soutiennent l'hypothèse selon laquelle les protéines ne seraient pas impliquées dans la formation de l'hémozoïne. Toutefois, les protéines ne peuvent pas être totalement exclues de ces mécanismes car des protéines inconnues, présentes à la surface des nanosphères lipidiques, pourraient intervenir dans les mécanismes de formation du pigment malarique.

Parallèlement, le lien entre les lipides et la formation de l'hémozoïne a été démontré dans d'autres organismes, *Schistosoma mansoni* et *Rhodnius prolixus*.(208) En effet, l'hémozoïne se formerait à l'intérieur de gouttelettes lipidiques sphériques, présentes dans l'intestin du vers. La répartition des cristaux d'hémozoïne n'est pas régulière puisque certaines gouttelettes sont remplies de cristaux tandis que d'autres ne présentent que quelques petits cristaux.(209) L'hémozoïne serait située à côté de la membrane interne des gouttelettes, en contact avec l'interface aqueuse. Dans le cas de *R. prolixus*, la formation d'hémozoïne se ferait dans des vésicules dont la membrane serait bicouche. La croissance des cristaux se ferait au niveau de la bicouche, dans l'environnement aqueux.(208) Ces résultats suggèrent que l'interface eau-lipide aurait un rôle prépondérant dans la formation de l'hémozoïne.

En dépit de ces avancées dans la compréhension du mécanisme de formation de l'hémozoïne, la nucléation de l'hémozoïne reste encore mal comprise. D'autre part, l'étude de la

nucléation de l'hémozoïne reste difficile. C'est pourquoi des études modèles ont été effectuées avec le modèle de β -hématine. En effet, il a été montré que les figures de diffraction de l'hémozoïne de *P. falciparum* sont semblables à celles de la β -hématine.(210, 211) De plus, l'hémozoïne a été caractérisée grâce à l'utilisation de différentes techniques spectroscopiques.(210, 212–215) Ces analyses ont permis de prouver que l'hémozoïne est chimiquement et spectroscopiquement identique à la β -hématine.

Il a été supposé que l'unité dimère fer-propionate de la β -hématine serait l'espèce de nucléation dans la formation de l'hémozoïne.(216) Cependant, ces dimères intermédiaires n'ont pas été observés en solution et il a été montré que l'acétate est un mauvais ligand de coordination de l'hémine.(217) Des simulations de dynamique moléculaire en milieux aqueux, soutiennent cette hypothèse, mais indiquent également que ces liens sont favorisés par un environnement non polaire.(218) D'autre part, la biocristallisation de la β -hématine serait initiée par un dimère π - π entre les deux porphyrines.(219) Ces conclusions s'appuient sur le fait que le dimère fer-propionate ne montre pas de recouvrement entre les groupements porphyrines et que la stabilité de ce dimère ne repose que sur les liaisons fer-propionate, instables en milieu aqueux(217). De plus, les groupements porphyrines seraient plus proches dans les dimères π - π et se recouvriraient mieux, augmentant ainsi la stabilité du dimère. Néanmoins, il a été évoqué que la distance moyenne entre les atomes de fer des groupements porphyrines dans les dimères π - π serait insuffisante par rapport à celle connue dans le cristal de β -hématine, ce qui impliquerait un réarrangement de la structure du dimère π - π pour pouvoir réaliser la nucléation.(220) Ces auteurs suggèrent que la nucléation de la β -hématine serait donc initiée par des dimères fer-propionate de différents types. Il existerait quatre formes distinctes : deux centrosymétriques et deux énantiomériques. La nucléation serait principalement due aux formes centrosymétriques, les centres énantiomériques quant à eux pourraient être responsables d'un désordre dans le cristal et ainsi engendrer un retard de croissance du cristal.

D'autre part, la protéine PF14_0446 de *P. falciparum*, appelée également HDP (heme detoxification protein) serait transportée du cytoplasme du globule rouge vers la vacuole digestive, lieu de biocristallisation de l'hème, grâce aux vésicules de transit, qui transportent également l'hémoglobine. Cette protéine serait impliquée dans les mécanismes de biocristallisation de l'hème en hémozoïne et pourrait donc devenir une cible intéressante dans le développement de nouvelles thérapeutiques.(221)

L'hémozoïne a longtemps été considérée comme un produit inerte, sans activité redox. Toutefois, un certain nombre d'études indiquent que l'hémozoïne possède une activité immunomodulatrice *in vivo* et *ex vivo* quand elle est endocytée par les macrophages et les cellules dendritiques.(222–224) Certaines études suggèrent que les lipides et les contaminants d'ADN, associés à l'hémozoïne brute, sont responsables d'interactions avec les cellules du système immunitaire(225, 226), tandis que d'autres, utilisant l'hémozoïne pure ou la β -hématine, ont montrés que les cristaux purs sont capables de produire les mêmes effets(227). La morphologie et l'homogénéité des cristaux de β -hématine seraient importantes dans son activité anti-inflammatoire et donc seraient importantes dans les études d'immunopathologie du paludisme.

La structure de la β -hématine a été étudiée par diffraction des rayons X.(211) Ces études ont révélé une répétition de dimères d'hémine où le fer ferrique de chaque monomère est lié au groupe propionate de son partenaire. Ces interactions fer-carboxylate sont supposées faire abstraction de l'activité redox des molécules d'hémine dans le cristal. Les études structurales ont également révélé des interactions de type liaisons hydrogènes qui permettent de relier les dimères dans une matrice à deux dimensions. Les interactions, qui stabilisent le cristal dans la troisième dimension, ont été moins bien décrites. Néanmoins, une analyse par "Extended X-ray Absorption Fine Structure" (EXAFS), au seuil K du fer, de l'hémozoïne et de la β -hématine(228) a révélé une incertitude dans la position des atomes d'oxygène dans les deux formes. De plus, une grande valeur du facteur de Debye-Waller de l'hémozoïne par rapport à celui de la β -hématine, a été observée. Ceci est le signe de désordre dans la molécule. Ces auteurs ont suggérés que les liaisons oxygène-Fe sont moins bien formées dans l'hémozoïne et par conséquent que le cristal est moins bien ordonné.

Toutefois, l'utilisation de la β -hématine dans les études cristallographiques reste justifiée par le fait qu'elle présente un meilleur rapport signal/bruit et que l'observation des pics de diffraction est net.(211) La morphologie de la β -hématine a été étudiée, afin de déterminer les sites possibles de liaison des médicaments antipaludiques et étudier comment ces liaisons peuvent influencer la croissance et la morphologie des cristaux. La morphologie des cristaux étant déterminée par les taux de croissance relatifs des différentes faces. Les cristaux de β -hématine se développent plus particulièrement le long de l'axe *c*, présentant ainsi les faces latérales {100} et {010} de façon prédominante, une face peu développée {011}, et une face mineure {001}.(229) Pour retarder la nucléation ou la formation de l'hémozoïne, les molécules antipaludiques devraient se fixer sur l'une des faces {001} ou {011}. Alors qu'un inhibiteur efficace de la nucléation ou de la formation de l'hémozoïne devrait se fixer sur l'une des faces {100} ou {010}.(230) Très récemment, il a été

montré que la face {100} serait en contact avec l'interface lipidique de la membrane de la vacuole digestive lors de la nucléation de l'hémozoïne. Les cristaux d'hémozoïne se développeraieent donc dans la phase aqueuse.(231, 232)

II.1.5.4.1.5. Les amino-4-quinoléines

II.1.5.4.1.5.1. La chloroquine

Comme vu précédemment, la chloroquine (CQ) est une amino-4-quinoléine qui a été développée dans les années 1930. Son utilisation a connu son apogée dans les années 40, malheureusement, des problèmes de résistances sont apparus dix-sept ans plus tard. Néanmoins, la CQ peut encore être utilisée dans les cas de paludisme dus à *P. vivax*.

Malgré de nombreuses années d'utilisation et de recherches, le mécanisme d'action de la CQ n'est pas encore totalement élucidé.

II.1.5.4.1.5.1.1. Mécanisme d'action de la CQ

De nombreux mécanismes d'action ont été proposés pour tenter d'expliquer l'activité de la CQ.

L'une des premières hypothèses suggérait que la CQ agissait comme intercalant de l'ADN(233), empêchant ainsi sa répllication et conduisant à la mort du parasite. Néanmoins cette hypothèse a été rapidement réfutée lorsqu'il a été montré que la CQ s'accumule dans la vacuole digestive et non dans le noyau. De plus, une telle interaction n'a pu être observée qu'à de fortes concentrations en CQ, supérieures à la dose active.(234)

Deux facteurs prépondérants déterminent donc le potentiel antipaludique des amino-4-quinoléines, le premier est la capacité d'accumulation de la molécule dans la vacuole digestive du parasite.(234, 235) Le second est l'affinité de la molécule pour l'hème.(236)

II. 1.5.4.1.5.1.1.1. Accumulation de la CQ dans la vacuole digestive

Au cours des vingt dernières années, l'accumulation de la CQ dans la vacuole digestive du parasite a été étudiée à travers de nombreuses études sur cellules vivantes. Néanmoins, la diversité des données obtenues n'a pas permis d'élucider les caractéristiques thermodynamiques et cinétiques de l'entrée de la CQ dans les globules rouges parasités par *Plasmodium*.(237)

Dès les années 1970, l'étude de l'accumulation de la CQ chez *P. berghei* (chez la souris) avait permis de montrer que la ^{14}C -CQ (à la dose de 10 nM) s'accumule de façon préférentielle dans les hématies parasitées par rapport au plasma, avec un ratio de l'ordre de 100 : 1 (érythrocyte : plasma). Chez *P. falciparum* (chez le singe hibou), des expériences similaires avaient permis de montrer que la ^{14}C -CQ s'accumule de façon préférentielle dans les hématies parasitées par rapport aux hématies saines. En effet, à la dose de 5 mg/kg, après 10 min d'incubation, 89% de la valeur relevée après 20 min d'incubation est mesurée dans les hématies parasitées alors que cette valeur n'est que de 66% dans les hématies saines, le ratio d'accumulation est donc d'environ 1,5 fois supérieur dans les hématies parasitées. Néanmoins, lors de ces études, les auteurs avaient relevé de grandes variations dans les différents groupes de singes étudiés, démontrant l'incertitude des résultats obtenus. Le traitement de cultures *in vitro* de *P. falciparum* sensibles à la CQ par de la ^3H -CQ (1 nM) a permis de montrer que la chloroquine s'accumule dans la vacuole digestive du parasite.(200, 238)

Il a été suggéré que cette accumulation dans la vacuole digestive serait due à des phénomènes de diffusion par pH trapping. En effet, la CQ est une base faible diprotique ($\text{pK}_{a1} = 8,1$; $\text{pK}_{a2} = 10,2$). Selon les modèles de bases faibles, la forme non-protonée de la CQ peut traverser facilement les membranes de l'érythrocyte, puis de la vacuole digestive. Le pH acide de la vacuole digestive (pH de 5,2 – 5,6), induit une forme diprotonée de la CQ, la piégeant ainsi à l'intérieur. Cependant, ce seul phénomène de diffusion n'est pas suffisant pour expliquer la forte accumulation de la CQ dans le compartiment vacuolaire. En effet, un transporteur perméase spécifique serait impliqué dans ce phénomène(239). Un transporteur membranaire comme *Pgh1* (*P. falciparum* P-glycoprotein homologue protein 1) ou *PfCRT* (*P. falciparum* chloroquine resistance transporter) pourrait faciliter le passage de l'extérieur vers l'intérieur du parasite(240).

Une autre étude a suggéré que le transporteur impliqué dans l'accumulation de la CQ, serait un échangeur Na^+/H^+ .(241, 242) Des inhibiteurs spécifiques de ce transporteur peuvent inhiber de manière compétitive l'accumulation de la CQ, ce qui permet de mettre en évidence le transport de la CQ par cet échangeur. Une autre hypothèse suggère que l'accumulation de la CQ chez *P. falciparum* serait liée à sa séquestration par interaction avec l'hème(237) et non à une stimulation de l'échangeur Na^+/H^+ . En effet, des inhibiteurs de protéases spécifiques, capables de bloquer la dégradation de l'hémoglobine et de stopper la libération d'hème, inhibent également l'accumulation de la CQ.

Les différentes méthodes et les nombreuses conditions expérimentales utilisées dans ces expériences rendent les conclusions difficiles. En effet, les conditions de dosage du transport de la CQ varient considérablement dans chacune des études (par exemple l'hématocrite, la parasitémie, les conditions de tampon, culture synchrone ou asynchrone, etc...). D'autre part, dans la plupart des expériences, les conditions utilisées ne sont pas représentatives du milieu physiologique puisque l'utilisation de méthodes de radio-traçage oblige l'ajout de variables exogènes, telles que des tampons. En outre, la nature (^{14}C -CQ ou ^3H -CQ) ou la concentration de la sonde utilisée ne permettent pas l'obtention de résultats homogènes. Par ailleurs, la détermination de la quantité de drogue accumulée dans la vacuole digestive reste difficile. Elle a été estimée à 10 - 50 μM selon les conditions utilisées.(239)

II.1.5.4.1.5.1.1.2. Inhibition de la formation et de la nucléation de l'hémozoïne

La formation de l'hémozoïne est essentielle à la survie du parasite *Plasmodium*.(236) Les amino-4-quinoléines sont capables d'inhiber la formation de ce pigment(197, 198, 200, 243), néanmoins, le mécanisme exact de cette interaction n'est pas totalement clarifié.(229) De nombreuses hypothèses ont été proposées pour tenter d'expliquer les mécanismes permettant aux quinoléines, et plus particulièrement à la CQ, d'inhiber la formation de l'hémozoïne.

Dès 1960, des expériences en UV-visible avaient permis de mettre en évidence la formation d'un complexe entre la CQ et l'hématine (ferriprotoporphyrine IX ou FP).(244) En solution aqueuse, l'ajout de CQ engendre des modifications importantes sur la forme de la bande de Soret de la FP. Néanmoins, peu de modifications d'intensité ont été observées.(236) En solution mixte(245) (solution aqueuse de DMSO à 40% en volume) et en solution organique(246), un effet hypochrome est observé sur la bande de Soret, ce qui correspond à une diminution du coefficient d'absorption molaire. Les modifications observées dans ces spectres UV-visibles montrent que lors d'ajout de CQ, la structure initiale de la FP est modifiée et a laissé sous-entendre que la CQ formerait un complexe avec la FP, sans toutefois préciser sa structure.

Plus tard, il a été suggéré que la FP serait un « récepteur spécifique » des amino-4-quinoléines, notamment de la CQ, et qu'il serait donc à l'origine de l'accumulation de la CQ dans la vacuole digestive du parasite.(247) Les auteurs avaient suggéré que la CQ se lierait à l'hème libre avec une stœchiométrie 1:2 (CQ : hème).(247) Cependant, différentes études(248–250) ont montré que la CQ se lierait de manière non covalente à un dimère μ -oxo de FP, c'est-à-dire une forme dimérique oxydée de l'hème (FP-O-FP). La CQ et la FP formeraient un complexe «sandwich», par

interaction π - π entre le noyau quinoléine de la CQ et les deux dimères μ -oxo de la FP, en milieu aqueux.(248) La stœchiométrie de ce complexe serait donc 1:2 (CQ : complexe μ -oxo). Bien que les cristaux de ce complexe n'ont jamais été obtenus expérimentalement, il a été suggéré que le complexe CQ-dimère inhiberait la formation de l'hémozoïne en déplaçant l'équilibre de dimérisation de la FP, réduisant ainsi la disponibilité des monomères FP pour l'incorporation dans le cristal d'hémozoïne.(200)

Plus tard, il a été suggéré que le noyau quinoléine de la CQ s'intercalerait directement entre deux molécules de FP par interaction π - π (251) ou que la CQ serait capable de rompre le dimère de FP(245) et ainsi engendrer la formation d'un complexe FP-CQ toxique, conduisant ainsi à la mort du parasite. De plus, les amino-4-quinoléines seraient capables de se placer à la surface de l'hémozoïne cristallisée empêchant ainsi la croissance du pigment malarique.(252, 253) Les amino-4-quinoléines influenceraient la morphologie des cristaux(253) et réduiraient ainsi leur vitesse de croissance(252), provoquant une accumulation d'hème libre dans la vacuole digestive et *in fine*, à la mort du parasite. Récemment, il a été suggéré qu'au pH de la vacuole digestive, la forme hétérodimérique $FP^+(HO^-)/FP^+(H_2O)$ serait la principale espèce et pourrait représenter l'espèce intermédiaire de la formation de l'hémozoïne. La CQ interagirait avec les faces de la FP qui ne portent pas de ligand, un complexe « sandwich » serait formé par interaction π - π .(254)

De plus, il a été montré que le mécanisme d'action de la CQ ferait intervenir une interaction de la drogue avec les faces {001} et {100} du cristal d'hémozoïne.(229) Les résultats de ces différentes études ne permettent pas de conclure réellement sur le mécanisme d'inhibition de l'hémozoïne par la CQ. Cette dernière pourrait donc se lier soit avec un monomère de la FP, soit avec un dimère μ -oxo de la FP, ou s'absorberait à la surface de l'hémozoïne.

D'autre part, des études de microscopie confocale en temps réel ont permis d'obtenir des mesures précises de la croissance de l'hémozoïne dans des parasites vivants.(255) Cette étude réalisée chez des parasites CQ-résistants et CQ-sensibles, a permis de montrer que la sensibilité des souches n'engendre que de très faibles différences dans la croissance du pigment malarique. De plus, un pic de croissance a été observé au stade anneau et au stade trophozoïte, après environ 15-30 heures. Il a été montré que la chloroquine n'inhiberait pas la croissance initiale des cristaux, pour la période allant de 15 à 22 heures, durant laquelle plus de la moitié des cristaux d'hémozoïne ont été formés. Après cette période, une diminution dans la quantité d'hémozoïne produite a été relevée. La CQ agirait sur la croissance de l'hémozoïne et non sur la nucléation.

II.1.5.4.1.5.1.1.3. Mécanismes de résistance

La résistance d'un médicament antipaludique a été définie comme étant « la capacité d'une souche de parasite à survivre et/ou à se développer, en dépit de l'administration et l'absorption d'un médicament, à dose égale ou supérieure de la dose habituellement recommandée mais en restant dans les limites de tolérance du patient ». (256, 257) Cependant, notons qu'un échec thérapeutique peut être dû à une mauvaise observance du patient ou à une mauvaise absorption du principe actif, c'est pourquoi les cas de résistance ne seront déclarés qu'après un dosage du principe actif dans le plasma.

En 1957, les premiers cas de résistance à la CQ ont été signalés en Colombie et en Thaïlande. (258, 259) Aujourd'hui, ce problème touche le monde entier (*Figure 20*). Les parasites CQ-résistants accumuleraient moins de CQ dans leur vacuole digestive que les souches CQ-sensibles, c'est cette diminution marquée qui sert de base à la résistance à la CQ. (260–262)

Depuis 1969 jusqu'à aujourd'hui, la quantification de la CQ dans les hématies parasitées et dans la vacuole digestive du parasite, a fait l'objet de nombreux travaux, non seulement pour connaître le mécanisme d'action de la CQ mais pour tenter également de comprendre les mécanismes de résistance du parasite. Fitch a été un précurseur dans ce domaine en utilisant des molécules de CQ marquées au carbone 14, avec un temps d'incubation de deux heures. (260) Selon cette étude la CQ s'accumule 600 fois plus dans les hématies parasitées par une souche CQ-sensible de *P. berghei* que dans le milieu de culture, 100 fois plus dans les hématies parasitées par une souche CQ-résistante de *P. berghei* que dans le milieu de culture, et 14 fois plus dans les hématies saines par rapport au milieu de culture. Ces expériences ont été effectuées à une concentration de CQ de départ de 10 nM. Krogstad et coll. (238) ont montré une diminution de la rétention de la CQ (concentration comprise entre 0,1 et 1 nM) dans des parasites CQ-résistants de *P. falciparum*. Cette diminution de rétention a été expliquée par une augmentation de l'efflux de CQ à l'extérieur du parasite et a été exprimée en pourcentage de la quantité de CQ tritiée ($[^3\text{H}]$ CQ) restante par rapport à la $[^3\text{H}]$ CQ initiale, en fonction du temps. L'efflux a été estimé à 40-50 fois plus rapide chez les clones CQ-résistants. Cependant, aucune quantification molaire précise de ce transport, c'est-à-dire le nombre de moles libres de CQ par parasite en fonction du temps, n'a pu être déterminée dans ces expériences. D'autres études ont ensuite été menées afin de comprendre les mécanismes impliqués dans l'efflux de la CQ et tenter de quantifier ce phénomène. (263–266) La plupart de ces études ont

été effectuées grâce à l'utilisation de médicaments tritiés, soit sur la totalité de la cellule (hématie parasitée entière), soit sur des parasites extraits. Afin de séparer les cellules marquées du surnageant, différentes approches de filtrations et centrifugations ont été effectuées. Les différents protocoles expérimentaux utilisés ont généré une grande variété de données dont aucune n'a permis de retrouver les résultats de 1987 dans lesquels l'efflux était estimé de 40 à 50 plus rapide chez les clones CQ-résistants par rapport aux clones CQ-sensibles.(238) Toutefois, un consensus a été trouvé. Une culture d'hématies parasitées par une souche CQ-résistante mise en contact par une dose de CQ (1-50 nM) accumulerait deux fois moins de CQ qu'une souche CQ-sensible traitée dans les mêmes conditions.(267) Dans certaines études, la concentration de CQ accumulée dans les érythrocytes sains a été soustraite à celle déterminée dans les érythrocytes infectés. Selon les méthodes utilisées, l'accumulation de CQ dans les souches CQ-sensibles par rapport aux souches CQ-résistantes serait de cent à mille fois plus importante.(265) Néanmoins, ces résultats sont à contraster avec le fait que de nombreuses approximations de modélisations mathématiques ont été réalisées.(265, 266) La plupart des résultats décrits sont en accord avec une accumulation de deux à dix fois plus importante pour les souches CQ-sensibles.(263–267) Il faut néanmoins rester prudent car les études réalisées font intervenir des molécules radioactives dont la CI_{50} n'a jamais pu être établie du fait des difficultés de mise en œuvre des expériences. De plus, les expériences, faisant intervenir des vacuoles digestives purifiées(261), ne permettent pas de rendre compte des mécanismes *in vitro* ou *in vivo* réels puisque la vacuole digestive est ainsi privée de tout contact avec le parasite et avec l'érythrocyte infecté. Or, les échanges entre ces différents compartiments sont importants pour le développement du parasite, il est donc risqué de s'affranchir de ces phénomènes.

La sensibilité *in vitro* des parasites CQ-résistants peut être partiellement restaurée par toute une gamme de bases faibles incluant les inhibiteurs de canaux calciques tels que le vérapamil (Figure 19).(238) Cette inversion de résistance est caractérisée par une augmentation de l'accumulation de la CQ et une diminution de la CI_{50} de la CQ chez les parasites résistants.

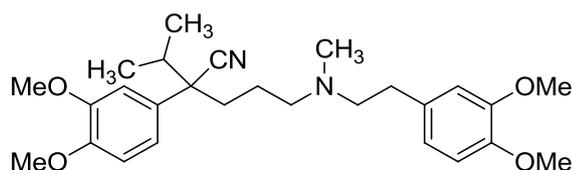


Figure 19 : Vérapamil



Figure 20 : Distribution des CQ-résistances chez *P. falciparum*.(268)

Pfcr

Wellems et coll.(269) ont analysé les descendants haploïdes issus d'un croisement génétique entre une souche CQ-résistante (Dd2) et une souche CQ-sensible (HB3) de *P. falciparum*. La comparaison séquentielle des allèles de *pfcr* des deux souches a permis de montrer que la résistance à la CQ peut être associée à une région d'environ 36 kB située sur le chromosome 7. (269) L'étude de ce segment a révélé la présence du gène *pfcr* (*P. falciparum* chloroquine resistance transporter)(259, 262) comportant 13 exons et codant pour une protéine transmembranaire (Figure 21) localisée dans la vacuole digestive.(270)

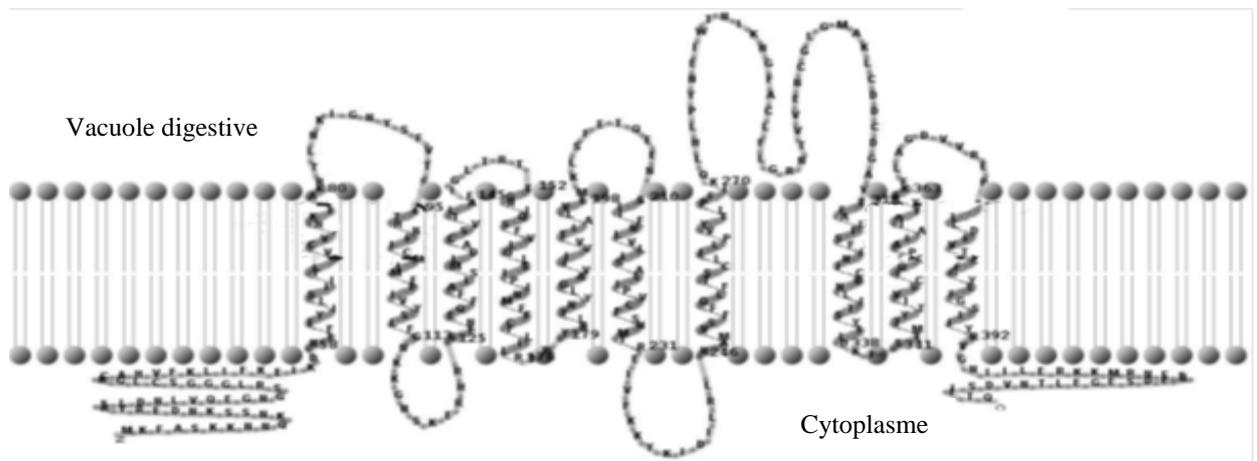


Figure 21 : Représentation schématique de PfCRT(267)

Le rôle des mutations de cette protéine dans la résistance à la CQ a été rapidement confirmé sur des isolats de terrain.(271, 272) PfCRT contiendrait dix domaines transmembranaires, orientés dans la membrane de la vacuole digestive du parasite et pour lesquels les azotes et les carbones terminaux s'étendraient vers le cytoplasme.(273) PfCRT est considérée comme un membre de la famille des transporteurs de métabolites et de médicaments (DMT).(273–276) Certains auteurs discutent de la nature du transporteur de la protéine.(277, 278)

La comparaison de différentes souches de *P. falciparum* CQ-résistantes a permis de montrer que l'haplotype de *pfCRT* est différent pour chacune des souches. PfCRT peut contenir entre 4 et 10 mutations selon les souches, avec un total de 32 résidus polymorphiques identifiés à ce jour. (279) Cependant, une mutation a été détectée dans presque toutes les souches CQ-résistantes étudiées.(280) Il s'agit de la substitution d'une lysine en position 76 par une thréonine (mutation K76T). Une seule exception a été relevée et concerne la substitution d'une lysine en position 76 par une alanine (mutation K76A).(281) Il a été suggéré que le changement de la lysine chargée par une thréonine neutre affecterait l'interaction électrostatique avec la chloroquine diprotonée.(262) Dans le mutant, l'absence d'interaction électrostatique permettrait à la chloroquine de traverser le canal. Cela se traduit par l'efflux de la drogue hors de la vacuole digestive.(262) De plus, il a été montré que l'inversion de cette mutation, peut restaurer la sensibilité de la souche CQ-résistante.(280) Les causes impliquées dans la variation du nombre ou de la nature des mutations accompagnant K76T restent incertaines. Néanmoins, il est intéressant de noter que la plupart des mutations observées sur

Pfcr1 sont situées sur la partie vacuolaire de la protéine et que la mutation K76T entraîne la perte d'une charge positive du site de liaison à la protéine du substrat supposé.(273)

Les mécanismes impliqués dans la diminution de l'accumulation de la CQ dans la vacuole digestive, ont fait l'objet de nombreux débats.(282, 283) Cependant, de nombreuses données indiquent que les souches CQ-résistantes ont la capacité d'expulser la CQ en dehors de la vacuole digestive. Il a été montré que la protéine Pfcr1 des souches CQ-résistantes pouvait être impliquée dans le transport de CQ radiomarquée dans le parasite. (278, 284, 285) La preuve évidente du transport de la CQ par Pfcr1(286) a été rapportée, en utilisant un système d'expression hétérologue : l'expression de Pfcr1 d'une souche de *P. falciparum* CQ-résistante, sur la membrane endosomale de *Dictyostelium discoideum* (amibe) a engendré une diminution de l'accumulation de la CQ dans l'amibe. Néanmoins, comme dans le cas des souches de paludisme CQ-résistantes, l'ajout de vérapamil restaure la sensibilité et empêche l'efflux de la CQ. Une démonstration directe du transport de la CQ via Pfcr1 a été réalisée grâce à un système d'expression utilisant des oocystes de *Xenopus laevis*.(287) Dans cette étude, deux formes de Pfcr1, l'une d'une souche de *P. falciparum* sauvage et l'autre d'une souche résistante (Dd2) à la CQ, ont été exprimées dans la membrane plasmique des oocystes. L'expression fonctionnelle de Pfcr1 à la surface des oocystes permet d'étudier en détail les propriétés de transport de la protéine. La forme issue de la souche résistante peut transporter la CQ alors que celle issue de la souche sauvage, n'en est pas capable. Le transport de la CQ est inhibé par action du vérapamil. Une des principales conclusions a donc été de démontrer que la mutation K76T est nécessaire mais non suffisante au transport de la CQ par Pfcr1, et que plusieurs autres mutations pourraient agir de concert avec K76T pour conférer la résistance aux parasites. En plus de l'inhibition par le vérapamil, le transport de la CQ par Pfcr1 peut également être inhibé par d'autres molécules antipaludiques, telles que la quinine, l'amodiaquine, la primaquine et la méfloquine mais aussi par l'amantadine, un agent antiviral qui a montré une activité antipaludique, notamment sur les souches CQ-résistantes.(288) En revanche, l'artémisinine n'a pas d'effet.(279)

Il avait été suggéré que le pH de la vacuole digestive était plus acide chez les clones CQ-résistants que chez les clones CQ-sensibles.(289) Cette acidification avait été présentée comme un élément de la résistance à la CQ, puisqu'elle empêcherait l'interaction de la CQ avec l'hème libre présente dans la vacuole, qui est moins soluble à des pH plus acide.(290) Cependant, une autre étude a permis de montrer qu'il n'existait pas de différence d'acidité dans le compartiment vacuolaire entre les différents clones, réfutant ainsi cette conclusion.(291) D'autre part, une

différence de volume de la vacuole digestive a été établie entre les clones CQ-sensibles et CQ-résistants, suggérant des modifications importantes du trafic des osmolytes (ions, solutés chargés...) qui pourraient entraîner des modifications de perméabilité de la membrane de la vacuole digestive vis-à-vis de ces espèces.(255) Très récemment, l'influence du potentiel électrique de la membrane de la vacuole digestive sur le transport de la CQ a été étudiée chez des levures *Saccharomyces cerevisiae* exprimant *Pfcrt* ou *Pvcrt*.(267) Cette étude a permis de montrer qu'une augmentation du transport de CQ est corrélée à une augmentation du potentiel électrique chez les souches CQ-résistantes mais pas chez les souches CQ-sensibles. Ces résultats suggèrent que l'augmentation de l'efflux de la CQ en dehors de la vacuole digestive des clones CQ-résistants peut être due à des modifications du potentiel électrique de la membrane vacuolaire, et que la CQ serait donc transportée sous ses formes chargées (protonée et diprotonée).(279)

De plus, il a été suggéré que *Pfcrt* se comporterait comme un transporteur plutôt que comme un canal ; le transport de la CQ médié par *Pfcrt* serait saturable, très dépendant de la température et son inhibition par différentes molécules serait dépendante de la concentration.(283) La saturabilité de la CQ représente un point important puisque l'addition de 100 nM de CQ dans le milieu extracellulaire engendrerait une concentration de CQ de l'ordre de 2 mM dans la vacuole digestive de parasites CQ-sensibles et entre 200 et 500 μ M dans la vacuole digestive de parasites CQ-résistants. Le mécanisme de résistance à la CQ pourrait être résolu en augmentant la dose de CQ, et de ce fait le niveau de CQ dans la vacuole digestive, de telle sorte que *Pfcrt* ne serait plus capable de maintenir la drogue à un niveau sub-létal.

Les tentatives, visant à générer des lignées viables de parasite dans lesquelles *Pfcrt* aurait été supprimée (knock-out), se sont révélées infructueuses, suggérant que *Pfcrt* serait essentielle à la vie du parasite.(280, 292) En effet, il a été suggéré que certaines des mutations qui accompagnent K76T pourraient servir à maintenir le rôle physiologique de la protéine.(293, 294) A ce jour, la seule fonction connue pour les transporteurs de métabolites de la vacuole digestive est l'efflux des peptides ou des acides aminés (produit par la digestion de l'hémoglobine), il a donc été proposé que *Pfcrt* fonctionnerait comme un exportateur d'acides aminés ou de peptides.(293) De plus, un certain nombre de peptides, dont plusieurs découlent de l'hémoglobine humaine, permettrait d'inhiber le transport de la CQ via *Pfcrt*. De plus, il a été montré que *Pfcrt* d'une souche CQ-résistance serait capable de transporter un peptide radiomarqué.(287) Toutefois, le même peptide ne serait pas transporté par *Pfcrt* d'une souche CQ-sensible, il reste donc difficile de définir si l'interaction des peptides avec *Pfcrt* de la souche résistante, serait possible grâce à sa ressemblance avec le substrat

endogène ou à sa similarité structurale avec le vérapamil et les médicaments quinoléiques.(287, 295)

Autres protéines impliquées dans la résistance à la CQ

Les premières études sur les résistances à la CQ ont montré qu'un efflux accéléré serait diminué ou inhibé par des inhibiteurs calciques, tel que le vérapamil (voir plus haut, *Figure 19*). Il a été suggéré que cet efflux impliquerait des glycoprotéines ATP-dépendantes similaires à celles présentes dans des lignées cellulaires tumorales de mammifères multi-résistantes (MDR).

C'est pourquoi, les recherches se sont orientées vers la découverte d'un transporteur spécifique de la CQ, analogue aux protéines de transport (mdr : multidrug resistance).(239) Deux gènes mdr-like ont été identifiés(296, 297), dont l'un d'eux, *pfmdr1* (*P. falciparum* multi-drug resistance 1) a été proposé comme gène responsable de la résistance du parasite à la CQ.(296, 298) Le gène *Pfmdr1* code pour la protéine PfPgh1 (*P. falciparum* P-glycoprotein homologue protein 1), dont les mutations, en particulier la mutation N86Y, ont été associées à une baisse de la sensibilité à la CQ.(299) Néanmoins, il a été montré que *pfmdr1* ne peut pas être la cause principale de la résistance à la CQ. En effet, une surexpression de ce gène n'est pas forcément corrélée à l'apparition de résistance à la CQ.(300, 301) De plus, il a été montré que l'efflux accéléré de la molécule à l'extérieur du parasite serait indépendant du phénotype et du nombre de copies de gène de *pfmdr1*.(302) Enfin, *pfmdr1* engendre un effet modulateur dans l'induction des résistances, mais un second gène serait nécessaire pour conférer un haut niveau de résistance à la CQ.(303) Ce gène serait également impliqué, probablement en association avec d'autres facteurs génétiques(304), dans la modulation de sensibilité à d'autres antipaludiques (méfloquine, halofantrine, quinine ou artémisinine).(303, 305–307)

Des études récentes, utilisant la transfection d'ovocyte *Xenopus Leavis*, fournissent une preuve directe du transport des antipaludéens par *PfPgh1*, produit du gène *pfmdr1*(308), conduisant à une nouvelle interprétation de la relation entre *PfPgh1* et le transport de la CQ(309).

D'autres travaux ont associé la résistance à la CQ à *pfcg2* (*P. falciparum* candidate gene 2)(310, 311). Ce gène, présent sur le chromosome 7, code pour la protéine Cg2 présente dans la vacuole digestive et dans la vacuole parasitophore. Cg2 serait impliquée dans les mécanismes de transport. Des études épidémiologiques et des expériences de transfection montrent que *Pfpg2*

n'interviendrait pas dans les mécanismes de résistance(240). De plus, le polymorphisme de Cg2 (candidate gene 2) a été trouvé dans des souches sensibles à la CQ, écartant cette hypothèse.(312)

Les mutations d'un autre transporteur de type ABC (ATP-binding cassette) seraient impliquées dans la résistance à la CQ, la protéine Pfmpr1 (*P. falciparum* multi-drug resistance associated protein 1). Bien que la relation entre Pfmpr1 et la résistance à la CQ n'ait pas été établie dans les isolats de terrain, des expériences de knock-down, c'est-à-dire d'inactivation de *Pfmpr1*, ont montré que cette protéine jouerait un rôle dans les mécanismes de résistance à la CQ. Par rapport à la souche CQ-résistante native de W2, les parasites exprimant moins *Pfmpr1* accumuleraient plus de CQ et afficheraient une sensibilité accrue à la drogue. (313) *Pfmpr1* serait située sur la membrane plasmique du parasite. Ceci suggérerait que la CQ serait exportée par la protéine en dehors de la vacuole digestive, réduisant ainsi sa concentration dans le parasite. (313) Il faut noter que la souche W2 utilisée dans cette étude, dérive de la souche Dd2 qui contiendrait des mutations de *pfmpr1* liées à la résistance à la CQ (Y191H et A437S).(314) Par conséquent, il reste à déterminer si ces mutations permettent à *pfmpr1* de modifier l'accumulation de la CQ dans la vacuole digestive, ou s'il s'agit d'une capacité inhérente de la protéine de type sauvage.

II.1.5.4.1.5.2. La ferroquine

II.1.5.4.1.5.2.1. Le ferrocène

En 1951, Pauson et Kealy synthétisèrent le ferrocène (Fc, *Figure 22*) pour la première fois.(315) En 1952, la structure du Fc a été résolue simultanément par les groupes de Woodward et Wilkinson(316). Il s'agit d'un complexe « sandwich » organométallique dans lequel un atome fer, à l'état d'oxydation 2^+ , est positionné entre deux cycles cyclopentadiényles plans.

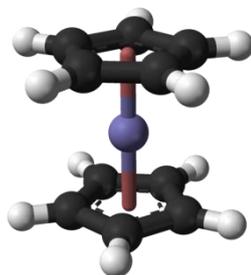


Figure 22 : Structure du ferrocène(317)

Le Fc est un complexe solide orange diamagnétique, soluble dans les solvants organiques mais pas dans l'eau. Contrairement à ce que l'on pourrait penser, au vu de sa structure, le Fc est très

stable dans les environnements non-oxydants. Cette molécule est lipophile et facilement fonctionnalisable. Sa relative faible toxicité (1320 mg/kg par voie orale et 500 mg/kg par voie intrapéritonéale chez le rat) en fait un composé intéressant dans le développement de molécules médicinales.(318)

Le Fc a été utilisé dans le remplacement de groupements fonctionnels dans des médicaments existants. Néanmoins, les résultats sont contrastés. En effet, dans certaines molécules comme les amphétamines(319), l'activité de la molécule initiale a été complètement perdue. Cependant, le spectre thérapeutique d'autres molécules, comme la pénicilline(320, 321), a été amélioré grâce à l'introduction du Fc. En effet, une diminution de la toxicité et une augmentation de l'activité antibactérienne sur des souches résistantes à la pénicilline de *Staphylococcus aureus* ont été observées.

Les propriétés anticancéreuses de dérivés ferrocéniques ont été étudiées dès la fin des années 70. Brynes et coll. ont reporté l'activité anticancéreuse sur des lymphocytes leucémiques P-388, de composés ferrocéniques portant un groupement amine ou amide.(322) L'utilisation du Fc dans le développement de composés anticancéreux a néanmoins connu son essor après la publication des travaux de Köpf et Köpf-Maier en 1984.(323) Depuis cette étude, de nombreuses molécules ferrocéniques ont été synthétisées et testées pour leurs propriétés anticancéreuses. L'un des exemples les plus étudiés est celui des ferrocifènes (Figure 23). En 1996, Jaouen et coll.(324) ont modifié la structure du 4-hydroxytamoxifène (Figure 23) par un Fc, le métabolite actif du tamoxifène (Figure 23) (un modulateur sélectif des récepteurs aux œstrogènes utilisé contre le cancer du sein de type hormonodépendant), en remplaçant le groupement phényle par un Fc.

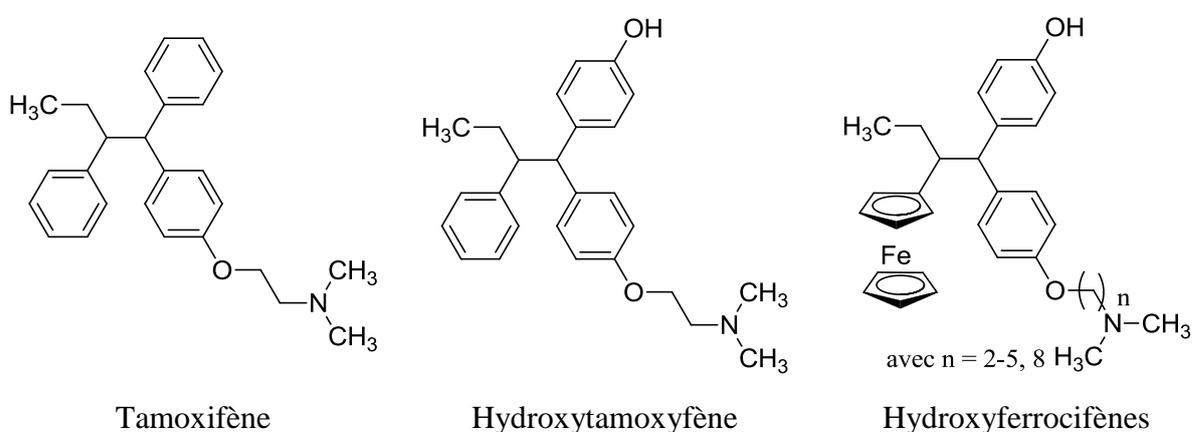


Figure 23 : Structures chimiques du tamoxifène, de l'hydroxytamoxifène et des l'hydroxyferrocifènes

Les ferrocifènes (variations de la chaîne portant le groupement diméthylamino, n=2-5,8) ont été élaborés pour combiner les propriétés anti-oestrogéniques de la molécule de départ avec l'effet potentiellement cytotoxique du Fc. L'activité antiproliférative des ferrocifènes a tout d'abord été évaluée sur deux lignées de cellules cancéreuses : MCF-7 (cancer du sein hormonodépendant) et MDA-MB-231 (cancer du sein non-hormonodépendant). Sur les lignées MCF-7, l'effet antiprolifératif des ferrocifènes seraient principalement anti-oestrogénique puisque son activité est similaire à celle de l'hydroxytamoxifène. En revanche, sur les lignées MDA-MB-231, les ferrocifènes ont révélé une CI_{50} basse (de l'ordre de 5 μ M) alors que l'hydroxytamoxifène est complètement inactif. Le mécanisme d'action des ferrocifènes n'est pas entièrement élucidé. Le stress oxydatif cellulaire causé par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites par réaction de type fenton, serait responsable de la cytotoxicité de ces dérivés *in vitro*.(325–327) De la même manière, des dérivés ferrocéniques solubles dans l'eau pourrait infliger des dommages oxydatifs *in vivo* grâce à l'équilibre rédox existant entre le ferrocène et le ferrocénium.(328) L'étape d'oxydation préliminaire, bien que le milieu cellulaire de la tumeur (hypoxie) soit réducteur, pourrait se produire dans les compartiments lysosomales, connus comme lieu d'accumulation des dérivés ferrocéniques.(329) Plus récemment, Jaouen et coll. ont étudié l'influence du pH de la solution et du potentiel redox de Fe^{II}/Fe^{III} sur les propriétés cytotoxiques de ces molécules.(330) Une voie plus complexe a donc été proposée : lors de l'oxydation du groupement ferrocénique, la charge positive créée est ensuite partiellement délocalisée sur le groupement hydroxyle en para au travers du système conjugué π , rendant ainsi le proton acide et accessible à une base. L'élimination de ce proton phénolique conduit à la formation d'une quinone méthide, une espèce électrophile capable de réagir avec des sous-unités telles que l'ADN, le glutathion ou les protéines.(331) Cette voie serait à l'origine de l'effet antiprolifératif des hydroxyferrocifènes.

Le Fc aurait donc un rôle non négligeable sur l'activité des ferrocifènes. Dans le milieu de années 1990, ces résultats prometteurs ont amené les chimistes médicaux à s'intéresser aux métallocènes dans la recherche antipaludique. En effet, l'action des ferrocifènes sur les cancers non hormonodépendants montre que les propriétés intrinsèques des hydroxytamoxifènes sont modifiées par le remplacement du benzène par un Fc. Le parasite du paludisme ayant développé des résistances à de nombreuses molécules antipaludiques, les chercheurs ont tenté de développer de nouvelles générations de médicaments antipaludiques afin de supprimer ces phénomènes de résistances. Un parallèle a pu être fait entre la stratégie appliquée aux hydroxyferrocifènes et les résistances du parasite *P. falciparum* envers les molécules antipaludiques. En effet, comme dans le cas du tamoxifène, le Fc a donc été introduit dans la structure de la CQ afin d'essayer de modifier

les propriétés physicochimiques et d'améliorer l'activité antipaludique de la molécule, notamment sur les souches CQ-résistantes. Parmi plus de cent molécules synthétisées et testées(332, 333), la ferroquine (SSR97193) s'est très vite imposée comme le « candidat médicament » idéal. Elle est actuellement développée par Sanofi et est entrée en phase II des essais cliniques en Septembre 2007.(141)

II.1.5.4.1.5.2.2. Propriétés pharmacologiques et résistance

L'embryotoxicité et la mutagénicité de la FQ se sont révélées négatives sur le test-Xenopus de tératogenèse des embryons de grenouilles (FETAX).(334) La FQ et ses énantiomères, solubilisés dans des solutions aqueuses, ont révélé des résultats négatifs au test d'Ames.(335) De plus, la FQ a répondu négativement dans le test des micronoyaux *in vitro* et *in vivo*. Fait intéressant, des expériences similaires ont montré que la CQ est faiblement mutagène et génotoxique.(336)

L'activité antipaludique *in vitro* de la FQ a été évaluée sur différentes souches de *P. falciparum* (Tableau 3). Les premiers résultats indiquent que la FQ présente des activités similaires à la CQ sur les souches CQ-sensibles, supérieures d'un facteur 5 sur les souches semi-résistantes à la CQ et nettement supérieures (facteur 22) sur les souches hautement résistantes à la CQ.(337–339) Ces résultats ont été confirmés par d'autres laboratoires qui ont testé la FQ sur d'autres clones de *P. falciparum*.(340, 341)

Clones	Origine	IC ₅₀ (nM)	
		FQ	CQ
3D7	Sierra Léone	3,4	21
W2	Indochine	7,6	485
D6	Afrique	5,6	23
FCM29	Cameroun	6,8	517
FCR3	Gambie	1,8	477
HB3	Honduras	13,4	18
106/1	Soudan	3,4	27
IMT Bres	Brésil	3,3	398
IMT 8425	Sénégal	1,9	29
IMT 10336	Comores	8,6	18
IMT K14	Cambodge	7,8	597
IMT K2	Cambodge	2,2	531
IMT K4	Cambodge	2,1	309
IMT L1	Niger	4,5	274
IMT Vol	Djibouti	7,3	262

Tableau 3 : Activités antipaludiques *in vitro* de la FQ et de la CQ(342)

Un modèle murin a ensuite été utilisé pour évaluer l'activité schizonticide *in vivo*. La FQ a été administrée, en sous-cutanée, à des souris infectées par *P. berghei*, selon le test de Peters de 4 jours.(343) Ces tests ont permis de montrer que le candidat médicament possède des valeurs de CI₅₀ et de CI₉₀, respectivement, de 1,22 et 1,95 mg / kg / jour, contre 1,39 et 2,7 mg / kg / jour pour la CQ pour un traitement de 4 jours.(337, 338) Des tests supplémentaires ont été effectués pour comparer l'action curative de la FQ par rapport à celle de la CQ. Le test d'efficacité curative a été réalisé comme suit : au lieu de déterminer la parasitémie au jour n°4, les souris survivantes sont surveillées durant 2 mois après la fin du traitement, avec des contrôles réguliers pour vérifier si la mortalité est liée à l'infection parasitaire.(337, 344) Les expériences ont montré que la CQ est curative à la dose de 50 mg / kg / jour durant 4 jours. Dans les mêmes conditions, la FQ est curative à une dose de 8,4 mg / kg / jour durant 4 jours.

Dans des conditions proches sur la souche *P. yoelii*, la CQ n'a pas révélé d'effet curatif à une dose de 60 mg / kg / jour. De façon intéressante, un traitement à 10 mg / kg / jour de FQ (sous

la forme FQ ditartrate, *Figure 24*) a permis de guérir 14/30 souris. Un effet curatif total (100% de réussite) a été observé pour des doses de 15 mg / kg / jour et 20 mg / kg / jour.

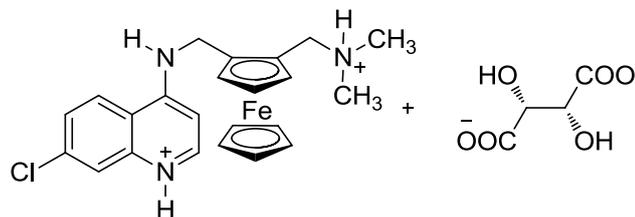


Figure 24 : FQ ditartrate(338)

Dans toutes ces expériences, les derniers parasites survivants ont été observés dans des globules rouges immatures (réticulocytes). L'affinité de certaines souches de *P. berghei* et de *P. yoelii* pour les globules rouges immatures est bien connue.(86) Pour contourner ce problème, une souche de *P. vinckei vinckei*, qui n'envahie pas les globules rouges immatures, a été sélectionnée.(337) Dans ces conditions, la FQ est curative à la dose de 8,4 mg / kg / jour sur des souris infectées par des souches CQ-sensibles de *P. vinckei vinckei*, mais également sur des souches CQ-résistantes. Dans les mêmes conditions, la CQ est curative à la dose de 31 mg / kg / jour sur les souches CQ-sensibles. Sur des souches CQ-résistantes, la CQ n'est pas curative à la dose de 58,9 mg / kg / jour. De plus, la FQ est également active par voie orale.(337, 344)

D'autre part, la FQ a été également testée sur des isolats de terrain de *P. falciparum* au Gabon(345–347), au Sénégal(348), au Cambodge(349–351), à la frontière birmane en Thaïlande(352) et au Kenya(353). Les résultats de ces différentes études ont permis de confirmer l'efficacité de la FQ sur le parasite, quel que soit son niveau de résistance à la CQ ou à d'autres antipaludiques,(332) tels que l'halofantrine, la méfloquine, la quinine et des dérivés d'artémisinine. Les variations phénotypiques du gène *pfcr*, supposées responsables de la résistance à la CQ, ne seraient pas corrélées avec la sensibilité de la FQ à *P. falciparum*. Ceci a d'ailleurs été démontré au niveau moléculaire sur des isolats du Cambodge.(354) De plus, les CI_{50} de la FQ et de la CQ ont été mesurées sur près de 146 clones de *P. falciparum* provenant du Kenya. L'étude des résultats de cette étude a permis de montrer que la mutation K76T du gène *pfcr* influence modestement l'activité de la FQ alors que dans le cas de la CQ, cette mutation engendre une nette chute d'activité. Ces résultats démontrent que la FQ pourrait être indiquée dans le traitement du paludisme à *P. falciparum*.(353) D'autre part, la FQ a été testée sur une quinzaine de souches génotypées pour le polymorphisme des gènes impliqués dans la résistance aux quinoléines, tels que

Pfcrt, *Pfmdr1*, *Pfmrp*, et *Pfnhe-1*. Les résultats de ces études suggèrent qu'il n'existe pas de résistance croisée entre la FQ et les autres quinoléines.(355) De plus, l'activité de la FQ a été évaluée *ex vivo* sur des souches multi-résistantes de *P. falciparum* et *P. vivax*. Cette étude a permis de montrer que la FQ est plus sensible que la CQ et qu'il existerait une sensibilité croisée entre la FQ et les autres aminoquinoléines.(356)

Des tentatives d'induction de résistance à la FQ ont été expérimentées sur différentes espèces de *Plasmodium*. Tous les essais effectués sur *P. falciparum in vitro* ont échoué. Les parasites mis sous pression de FQ (60 mg/kg/jours) durant 23 semaines, ont été incapables de se développer, même après avoir supprimé le composé du milieu.(354) *In vivo*, sur *P. yoelii*, les expériences ont abouti à un phénotype multirésistant (CQ, méfloquine et FQ) avec un très faible pouvoir pathogène. La souche n'a pu se développer que dans les érythrocytes immatures avec une parasitémie maximum d'environ 2%. Les souris infectées ont été guéries en absence de médicament. De plus, la résistance à la FQ ne serait pas fixée génétiquement puisque la résistance à la FQ a été rapidement perdue dès l'arrêt de la pression médicamenteuse (4-5 passages) ou après congélation. Dans ces deux mêmes conditions, la résistance à la chloroquine a été conservée. D'autre part, l'étude du génome de cette souche a permis de montrer que le gène *pymdr1* (orthologue de *pfmdr1*) ne présente pas les mutations : 86, 1034, 1042, et 1246 et que le gène *pycrt* (orthologue de *pfcr1*) ne présente pas la mutation K76T, qui sont des mutations impliquées dans la résistance à la CQ.(332) En résumé, les études pharmacologiques ont montré que la FQ est très active sur toutes les souches de *P. falciparum*, notamment sur les souches résistantes aux antipaludiques actuellement utilisés. La sensibilité à la FQ ne dépendrait pas des phénotypes impliqués dans la résistance aux autres quinoléines.

Les expériences pour induire une résistance *in vitro* ou *in vivo* montrent clairement que les coûts de mise en place de la résistance à la FQ sont très élevés pour le parasite. Néanmoins, il faut garder à l'esprit que la résistance ou la diminution de sensibilité existe pour la plupart des antipaludiques actuels. Le risque d'apparition de cette résistance augmenterait si la FQ était utilisée à grande échelle. Une façon de réduire ou de surmonter le risque est d'utiliser la FQ en association. La FQ a d'ailleurs été testée en association avec l'artésunate, dans le cadre de la phase IIb des essais cliniques.(141) D'autres associations seront certainement testées prochainement.(357)

Au cours de la phase 1, 173 sujets (ou patients) mâles ont été répartis dans deux essais réalisés sur des sujets caucasiens sains, quatre essais conduits chez des patients africains infectés par *P. falciparum* mais ne présentant pas de symptôme, et une phase IIa conduite pour évaluer

l'efficacité et les risques liés à un traitement avec des doses croissantes de FQ. L'étude de phase IIa incluait des patients africains adultes infectés par *P. falciparum* et avec une parasitémie comprise entre 100 et 200000 parasites/ μ L de sang). Les résultats du profil pharmacologique de la FQ seront détaillés plus loin.(358)

La phase IIb a été réalisée sur un groupe de 440 patients issus de sept pays africains différents. Cette étude a été effectuée afin d'évaluer les risques et l'efficacité de la FQ seule ou en association avec l'artésunate à trois niveaux de dosage différents, chez des patients infectés par *P. falciparum*. La première et la dernière cohorte ont été réalisées sur des adultes, des adolescents et des enfants de plus de 20 kg.(357) Cette phase a été stoppée pour des raisons stratégiques.(141)

II.1.5.4.1.5.2.3. Chimie de la FQ

La synthèse de la FQ est relativement simple, rapide et économique puisqu'elle ne compte que quatre étapes (Figure 25). La FQ est obtenue à partir de la *N,N*-diméthyl(ferrocénylméthyl)amine qui est commerciale. L'aldéhyde ferrocénique provient d'une séquence en deux étapes impliquant d'abord une métallation avec le *tert*-butyllithium puis une réaction avec de le diméthylformamide.(359) L'aldéhyde est ensuite converti en oxime, qui est ensuite réduite en amine primaire. La réaction de substitution nucléophile aromatique entre l'amine et la 4,7-dichloroquinoléine permet d'obtenir la FQ.(338)

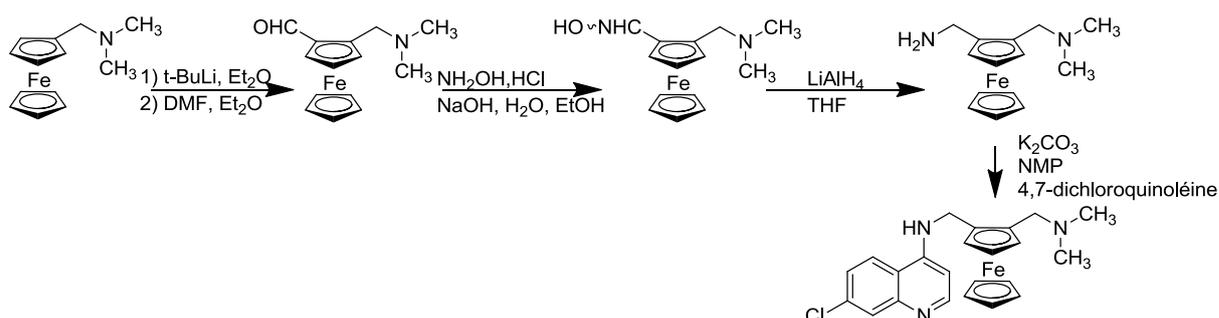


Figure 25 : Schéma de synthèse de la FQ

Très récemment, la société Sanofi a développé une méthode de synthèse alternative (Figure 26) dans laquelle l'aldéhyde ferrocénique est condensé avec la 4-amino-7-chloroquinoléine par amination réductrice convergente. Cette nouvelle voie de synthèse permet de s'affranchir de l'utilisation de l'hydroxylamine qui peut être instable et explosive et de LiAlH_4 qui est

inflammable. D'autre part, la réduction du nombre d'étape permet de diminuer le coût de revient du médicament.(360)

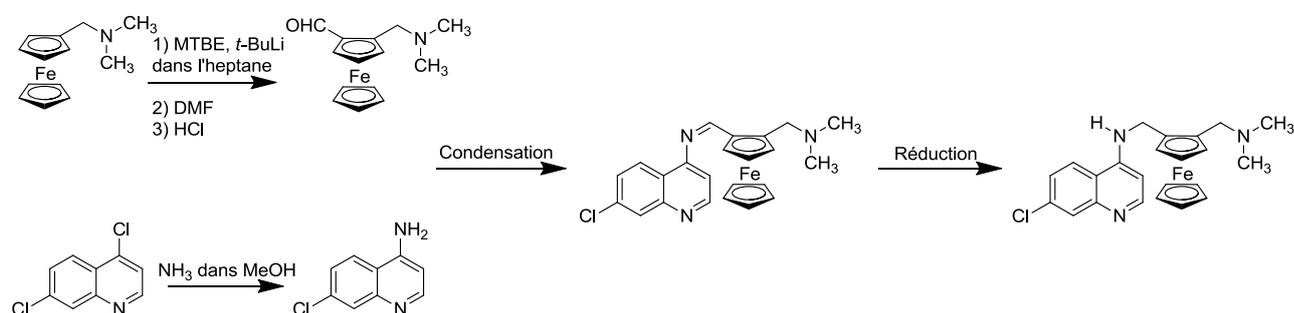


Figure 26 : Nouvelle voie de synthèse de la FQ (les conditions expérimentales de la condensation et de la réduction sont détaillées dans le brevet)(360)

La structure de la FQ comporte un groupement ferrocénique disubstitué en positions 1 et 2, la FQ présente donc une chiralité plane (Figure 27).

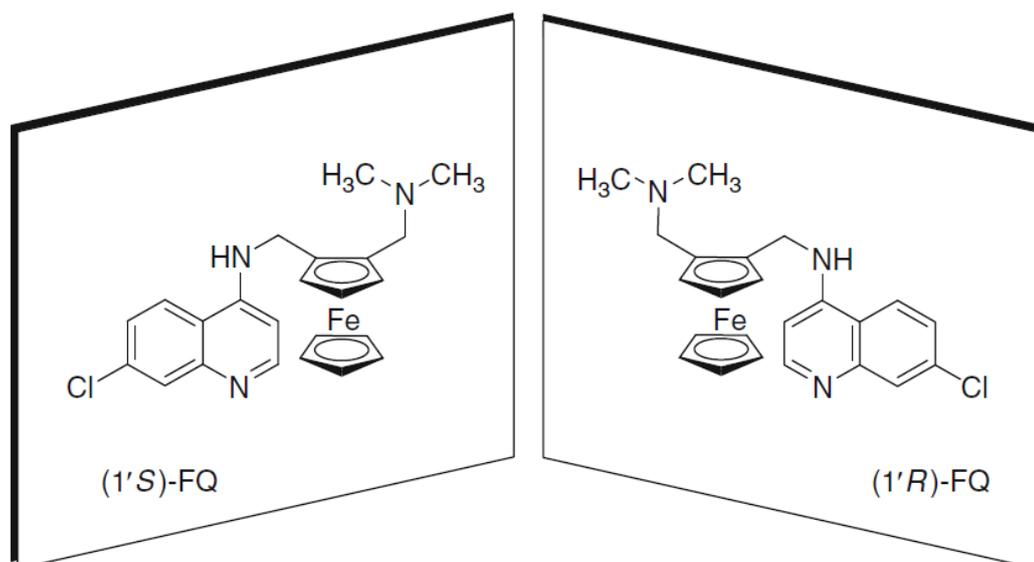


Figure 27 : Structure des deux énantiomères de la FQ(361)

Les énantiomères d'une même molécule peuvent induire des réponses différentes dans l'organisme. L'activité du mélange racémique peut être due à l'un des énantiomères, l'autre pouvant être inactif ou toxique. De plus, les énantiomères peuvent présenter des différences dans leurs propriétés pharmacocinétiques.(362, 363) Ces différences peuvent représenter un obstacle pour le développement de médicaments. Une méthode de séparation des deux énantiomères de la

FQ a donc été mise au point ; cette approche comporte une étape de résolution cinétique biocatalytique réalisée à l'aide de la lipase *Candida rugosa*.(344)

L'activité antipaludique, *in vitro* et *in vivo*, des deux énantiomères purs a été comparée avec celle du racémique.(344) *In vitro*, les deux énantiomères de la FQ et le racémique se sont avérés aussi actifs contre les souches CQ-sensible (HB3) et CQ-résistante (Dd2) de *P. falciparum*. *In vivo*, les deux énantiomères ont présenté une activité légèrement inférieure à celle du racémique, contre des souches CQ-sensibles et CQ-résistantes de *P. vinckei vinckei*. Ceci suggère que les deux énantiomères présentent soit un effet additif, soit un effet synergique. En outre, l'énantiomère (1'R)-FQ est légèrement plus actif chez la souris que l'isomère (1'S)-FQ, ce qui suggère qu'il y a des différences mineures de propriétés pharmacocinétiques entre les deux énantiomères. Lors des phases I et II d'essai clinique, les tests effectués sur le mélange racémique n'ont présenté aucun effet indésirable critique.(358) Ces résultats ont permis l'utilisation du racémique pour la phase IIb des essais cliniques afin de diminuer le prix de revient.(141)

Les coefficients de partage apparents ($\log D$) de la CQ et de la FQ ont été mesurés aux pH vacuolaire (5,2) et cytosolique (7,4) (Tableau 4).(364) Au pH cytosolique, la FQ serait plus de cent fois plus lipophile que la CQ, alors qu'au pH vacuolaire, la FQ serait environ trois fois plus lipophile que la CQ.

Concernant les propriétés de base faible, la comparaison des pK_a des deux molécules indique que la FQ est moins basique que la CQ (Tableau 4).(337) Ce qui pourrait suggérer un moins bon passage membranaire par pH trapping. Une étude approfondie de l'accumulation de la FQ comparativement à la CQ devra donc être réalisée.

Composé	pK_{a1}	pK_{a2}	$\log P$	$\log D_{5,2}$	$\log D_{7,4}$	$\log K$
CQ	10,03	7,94	4,63	-1,20	0,85	5,52
FQ	8,19	6,99	5,10	-0,77	2,95	4,95

Tableau 4 : Propriétés physicochimiques de la FQ

II.1.5.4.1.5.2.4. Métabolites de la FQ

La FQ est métabolisée par différents cytochromes P-450 (CYP2C9, CYP3A et CYP2D6), la contribution relative de chaque isoforme impliquée dans la clairance hépatique métabolique globale est inférieure à 50%. Les principaux métabolites (Figure 28) de la FQ sont générés par

désalkylation des chaînes latérales, menant aux dérivés monodésalkylés, N-desméthylferroquine (DMFQ) puis aux dérivés didésalkylés, N-disdesméthylferroquine (di-DMFQ).(365)

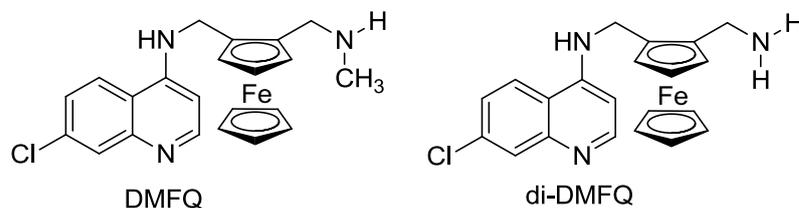


Figure 28 : Métabolites majeurs de la FQ

Les deux métabolites sont actifs contre les souches CQ-sensibles de *P. falciparum*. Néanmoins, seule la DMFQ a révélé une activité significative contre les souches CQ-résistantes.(352, 354) De plus, lors des essais cliniques de phase I, il a été montré que la DMFQ serait formé rapidement. D'autre part, le temps de demi-vie de la DMFQ (31,4 jours) serait pratiquement deux fois supérieur à celui de la FQ (15,9 jours) et sa concentration sanguine serait supérieure à celle de la FQ dès le 5^{ème} jour après le traitement (et à partir du 7^{ème} jour pour le traitement à doses multiples). La DMFQ pourrait donc participer à l'activité intrinsèque globale de la FQ, contrairement à la di-DMFQ.(366)

Une autre voie de dégradation de la FQ engendre la formation de la 4-amino-7-chloroquinoléine (Figure 29). Ce métabolite, formé également dans les voies de dégradation de la CQ, ne présente pas d'activité antipaludique.(367)

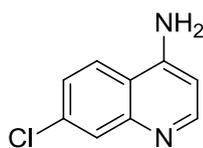


Figure 29 : Structure de la 4-amino-7-chloroquinoléine

II.1.5.4.1.5.2.5. Paramètres pharmacocinétiques de la FQ et de ses métabolites

La FQ a montré un bon transport transépithélial dans un modèle de l'épithélium intestinal Caco/TC7 monocouche, indépendamment du pH et des inhibiteurs de Pgp. Ceci indique une bonne absorption par voie orale, ce qui confirme les résultats expérimentaux déjà obtenus lors des tests *in vivo* sur des souris traitées par la FQ de manière per os.(337, 344) En outre, la molécule présente un faible taux de transfert à travers la barrière hémato-encéphalique dans un modèle *in vitro* de cellules

endothéliales bovines.(361) Par administration intraveineuse et orale, la FQ a montré une grande clairance plasmatique, un grand volume de distribution, et une grande biodisponibilité (60%).(361) Les concentrations plasmatiques restent élevées durant 3 à 8 h après administration orale, ensuite elles diminuent lentement au cours des premières 24 h. Une grande distribution a été observée dans le foie et dans le cerveau. Ces propriétés sont proches de celles déjà observées pour la CQ. En ce qui concerne la distribution érythrocytaire/ plasma, les trois modèles testés (rat, macaque et humain) ont convergé vers une accumulation élevée de la FQ dans les globules rouges (68-85%).(361)

D'autre part, un test de 14 jours a été réalisé sur des rats, en utilisant une dose (10mg/kg) équivalente de CQ et de FQ. La CQ cause une mortalité de 100% alors que la mortalité causée par la FQ n'est que d'environ 7%. Le foie, et dans une moindre mesure, les reins, semblaient être les deux principaux organes cibles.(361) Les phases I et IIa des essais cliniques ont confirmé la bonne tolérance de la FQ et sa faible toxicité par rapport à la CQ.(357)

Lors de la phase I des essais cliniques, les paramètres pharmacocinétiques de la FQ ont été caractérisés pour des administrations en dose simple et en dose multiple. De plus, les interactions potentielles de la FQ avec le régime alimentaire ont été étudiées.(366)

Les données concernant l'administration de FQ en dose simple ont révélé une absorption rapide et une augmentation linéaire de la concentration sanguine maximale pour une dose comprise entre 400 et 1200 mg. Dans l'ensemble des résultats, les concentrations sanguines maximales ont montré une variabilité interindividuelle modérée. Le temps de demi-vie apparent de la FQ serait d'environ 16 jours, ce qui est plus faible que le temps de demi-vie de la CQ ($t_{1/2} > 30$ jours). Il faut noter que le temps de demi-vie de DMFQ serait de 31,4 jours et que sa concentration sanguine serait supérieure à celle de la FQ après 5 jours.

La phase d'administration en dose multiple (3 jours de traitement) à 1000 mg a dû être interrompue à plusieurs reprises à cause de changements morphologiques au niveau de l'onde T, qui reflète la régénération des cellules cardiaques. Un patient n'a pas supporté la dose de 1000 mg mais à tout de même continué le traitement à une dose journalière limitée comprise entre 400 et 800 mg. Pour cette gamme de dose, une variabilité interindividuelle modérée a été observée.

Les résultats des tests d'interaction alimentaire montrent que l'efficacité de la FQ n'est pas corrélée avec un régime alimentaire particulier.

Pour conclure, la FQ possède un bon profil pharmacologique après absorption par voie orale, les essais cliniques de phase I ont montré une très bonne tolérance à la FQ administrée en dose unique, même à forte dose. Ces résultats, associés à l'activité de la FQ et de son principal métabolite, contre les couches CQ-résistantes de *P. falciparum*, sont prometteurs pour le développement futur de la FQ comme nouvel antipaludique, ce qui a été confirmé par son passage en phase IIb d'essais cliniques.

II.1.5.4.1.5.2.6. Effet de la FQ sur la gamétocytogénèse et sur la transmission vectorielle

Mustfa et coll.(368) ont étudié l'effet de la FQ sur la gamétocytogénèse et sur la transmission vectorielle du paludisme. Cette étude a été réalisée grâce à l'utilisation d'un modèle animal murin infecté par *P. yoelii yoelii*. La transmission de l'infection aux souris Swiss a été assurée par des anophèles *Stephensi* maintenues en animalerie. La FQ et l'artésunate ont été testées à des doses infracuratives de 5 ou 10 mg/kg. L'efficacité de ces molécules a été déterminée quantitativement par la mesure de la gamétocytémie, c'est-à-dire par la mesure du nombre de gamétocytes ingérés par le moustique, et qualitativement par le comptage des oocystes formés sur l'estomac du moustique, permettant ainsi de mesurer l'activité des gamétocytes. Ces mesures ont été effectuées sur des groupes de 30 moustiques à trois temps différents : avant le traitement, 1h30 après le traitement et 5h00 après le traitement. Quantitativement, les résultats de cette étude montrent qu'après traitement, une augmentation des gamétocytes circulant est observée et ce quelle que soit la dose utilisée. Cependant, qualitativement, les résultats montrent des altérations morphologiques des gamétocytes circulants (amas de pigments, latéralisation des gamétocytes dans l'hématie) et une moindre infectivité des gamétocytes pour les moustiques gorgés après la prise thérapeutique.

Il a été démontré que l'infectivité des gamétocytes, mesurée par la quantité d'oocystes comptés sur l'estomac du moustique, est diminuée de 70 % pour les souris traitées par la FQ et de 85 % pour les souris traitées par l'artésunate. Ces résultats préliminaires montrent que la FQ pourrait être utilisée comme traitement prophylactique.

II.1.5.4.1.5.2.7. Etat de la compréhension du mécanisme d'action de la FQ au début de la thèse

Actuellement, le mécanisme d'action de la CQ n'est pas encore totalement élucidé. Néanmoins, il semblerait que son activité antipaludique soit liée à sa structure et sa localisation préférentielle dans la vacuole digestive du parasite où elle inhiberait la formation de l'hémozoïne.

La FQ étant un analogue ferrocénique de la CQ, les premières études sur son mécanisme d'action ont été effectuées en comparaison avec celui de la CQ.

II.1.5.4.1.5.2.7.1. Propriétés de base faible et accumulation

A ce jour, aucun mécanisme de transport spécifique n'a encore été déterminé pour la FQ. En l'absence de ces transporteurs, les ratios d'accumulation vacuolaire (VAR) peuvent être prédits à partir d'une dérivation de l'équation de Hendelson-Hasselbach utilisant les valeurs calculées du $\log D$.

Toutefois, il est important de noter que l'application de cette loi suppose que les molécules protonées (donc chargées) soient incapables de traverser les membranes, qu'il n'existe pas de liaison intracellulaire du composé et que le gradient de proton entre le cytosol et la vacuole digestive du parasite soit de 2,4 unités de pH.

Pour une base diacide, le $\log D$ est fonction des constantes d'acidité (pK_a) et du coefficient de partage ($\log P$), d'après l'équation :

$$\log D \text{ calculé} = \log P - \log [1 + 10^{(pK_{a1} - \text{pH})} + 10^{(pK_{a1} + pK_{a2} - \text{pH})}]$$

L'utilisation de cette formule, amène à penser que la FQ (VAR = 6402) ne s'accumulerait pas autant que la CQ (VAR = 19521) dans la vacuole digestive. Néanmoins, compte tenu du degré élevé de variabilité des méthodes expérimentales (les pK_a ont été déterminés dans un mélange dioxane-eau et le $\log P$ dans un mélange octanol-eau), les résultats pourraient être incertains.

Il est possible de calculer le VAR en utilisant les valeurs expérimentales du $\log D$ grâce à la formule suivante :

$$\text{VAR} = 10^{(\log D_{7,4} - \log D_{\text{pH}})}$$

La FQ s'accumulerait 50 fois plus que la CQ dans la vacuole digestive du parasite. Cependant, la variabilité des résultats obtenus est due au fait que les variables utilisées dans ces calculs proviennent de différentes sources, rendant les conclusions difficiles. De plus, la présence de transporteur spécifique ne peut pas être écartée.

Plus récemment, les $\log D$ et VAR de la CQ et de la FQ ont été déterminés à différents pH (*Figure 30*) pour tenter de comprendre le comportement des deux molécules dans le parasite.(369)

Les résultats de cette étude ont montré que quel que soit le pH, la FQ est plus lipophile que la CQ d'un facteur 100.

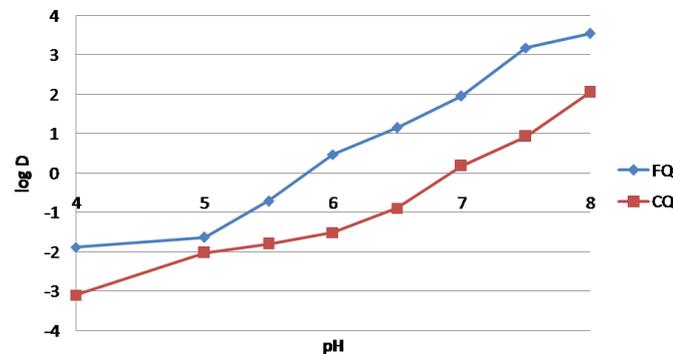


Figure 30 : $\log D = f(\text{pH})$

De plus, les valeurs du VAR de la FQ et de la CQ sont très similaires entre les valeurs de pH 6 et 8 (Figure 31). En revanche, en dessous de pH 6, la FQ s'accumulerait beaucoup plus que la CQ. Ce qui est intéressant puisque le pH vacuolaire est voisin de 5,2.

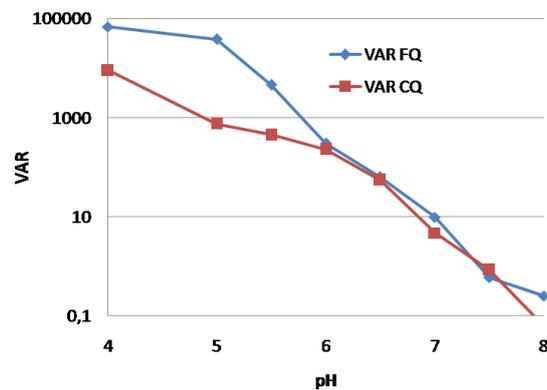


Figure 31 : $\text{VAR} = f(\text{pH})$

Ces résultats laissent supposer que la CQ et la FQ auraient un comportement similaire dans le cytosol mais différent à l'intérieur du compartiment acide.

A ce stade, il existait donc de nombreuses incertitudes concernant la concentration de FQ par rapport à celle de CQ dans la vacuole digestive. Des données expérimentales sont donc nécessaires pour valider ou infirmer les modèles mathématiques.

II.1.5.4.1.5.2.7.2. Inhibition de la formation de l'hémozoïne

L'étude d'analogues quinoléiques de la CQ a permis de montrer les relations structure-activité existantes dans cette famille de composés. Le groupement 4-aminoquinoléine apparaît ainsi essentiel pour la formation de complexe avec la protoporphyrine, tandis que l'atome de chlore serait utile à l'inhibition de la croissance du pigment malarique.(370) Ces éléments étant présents dans la FQ, il a été envisagé que l'inhibition de la formation de l'hémozoïne était liée à l'activité de la FQ.

L'interaction de la FQ avec l'hématine monomérique, a été étudiée dans une solution aqueuse de DMSO à 40% (pH 7,5) à 25°C. La bande de Soret de l'hématine à 402 nm a été suivie en fonction de la concentration de FQ, après avoir effectué les corrections liées à la dilution et à l'absorbance de la FQ à cette longueur d'onde.(364) Il a été montré que la FQ forme un complexe avec l'hématine (stœchiométrie 1:1) et une constante d'association identique à celle de la CQ ($\log K = 4,49 \pm 0,05$).(364) Cette valeur étant du même ordre de grandeur que celle déterminée pour la CQ ($5,52 \pm 0,05$).(370) Dans ces conditions, la FQ inhiberait la formation de la β -hématine. Ceci a été démontré par l'analyse du spectre infra-rouge de la solution, qui montre que les pics caractéristiques de la β -hématine, à 1662 et 1209 cm^{-1} , sont absents du spectre. Suggérant que la FQ est un très bon inhibiteur de la formation de la β -hématine. D'autre part, l'inhibition de la formation de la β -hématine par la FQ diprotonée a également été déterminée grâce à des tests BHIA (β -hematine inhibitory activities), les résultats sont similaires à ceux obtenus avec la CQ. Une inhibition dose-dépendante de la formation de la β -hématine a été obtenue. Une inhibition de 100 % n'a pas pu être atteinte, néanmoins, à 50 % le rapport molaire entre la drogue et l'hématine était de 0,78 pour la FQ alors que dans les mêmes conditions il était de 1,90 pour la CQ. Ceci montre que la FQ est un meilleur inhibiteur de la formation de la β -hématine que la CQ dans ces conditions.(364)

D'autre part, les potentiels de surface électrostatique moléculaire des formes diprotonées de la FQ (*Figure 32 a*) et de la CQ (*Figure 32 b*) ont été calculés au niveau de théorie DFT-B3LYP/LANL2DZ. La FQ et la CQ ont montré de grandes similarités au niveau du noyau quinoléine, où la molécule interagirait avec l'hématine. Un mode similaire d'interaction entre ces molécules (FQ ou CQ) et l'hématine a donc été suggéré.(364) Néanmoins, il est important de noter que les potentiels de surface électrostatique moléculaire diffère énormément au niveau de la chaîne latérale des deux molécules puisque la FQ contient un groupement ferrocénique et pas la chloroquine.

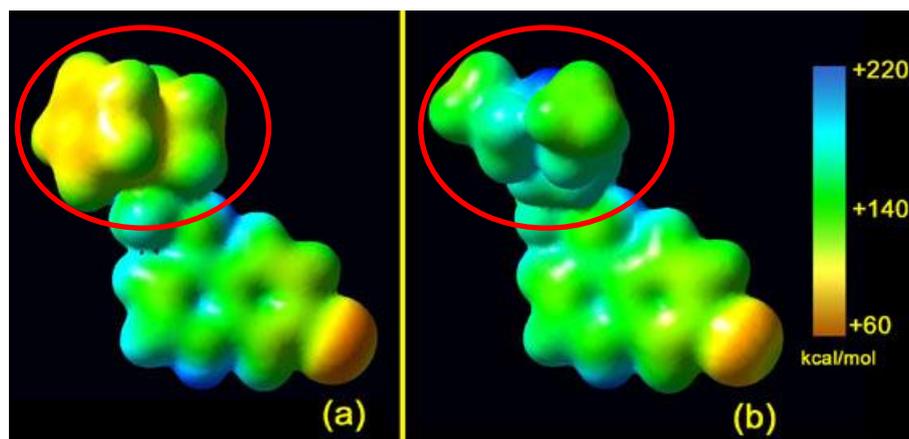


Figure 32 : Potentiels de surface électrostatique moléculaire des formes diprotonées de la FQ (a) et de la CQ (b).(364)

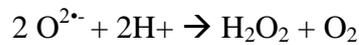
II.1.5.4.1.5.2.7.3. Activité rédox de la FQ

Il a été suggéré que la différence d'activité entre la FQ et la CQ pouvait être due à la présence du Fc.

Suite à la découverte du potentiel anticancéreux de nombreuses molécules ferrocéniques(371), le rôle du Fc a été étudié. Il a été montré que les dérivés ferrocéniques sont incapables de limiter la croissance des cellules cancéreuses mais que les sels de ferricinium résultants présentent une activité cytotoxique et la capacité de produire des radicaux hydroxyles dans des conditions physiologiques.(325) Comme vu précédemment, il a été décrit que les dérivés ferrocéniques de l'hydroxytamoxifène présentent une activité antiproliférative importante sur des lignées cellulaires cancéreuses non-hormonodépendante de cancer du sein. Les auteurs ont suggéré que l'activité cytotoxique de ces dérivés serait due à l'oxydation du Fe^{II} en Fe^{III} qui engendrerait la production *in situ* de radicaux, montrant que la présence du ferrocène est essentielle à l'activité de ces molécules. Pour vérifier ceci, des analogues ruthénium des ferrocifènes ont été synthétisés.(372) Comme le fer, le ruthénium est un métal de transition. Il se situe sur la colonne 8, comme le fer mais à la ligne 5 (le fer est sur la ligne 4) de la classification périodique. Il avait donc été suggéré que le potentiel d'ionisation de ces molécules devraient être plus élevé et que l'on pourrait donc s'attendre à une meilleure activité antiproliférative. Cependant, les hydroxyruthénocifènes ne présentent pas d'activité antiproliférative sur les lignées résistantes au tamoxifène. Bien que le potentiel d'oxydation du ruthénocène soit facilement accessible *in vivo*, la haute réactivité du cation formé engendrerait immédiatement la formation d'une autre espèce, avant même que la charge positive n'ait pu se délocaliser. De plus, il a été montré que le cation ferricinium est stable dans la

plupart des milieux alors que le cation ruthénocénium est instable dans pratiquement tous les milieux.(373–379) Néanmoins, les auteurs ont suggéré que ces molécules pouvaient être utilisées comme sondes en radio-imagerie isotopique.(372, 380) Tout ceci laisse supposer que la différence d'activité antiproliférative de ces molécules serait due à la différence de comportement rédox du ferrocène et du ruthénocène.

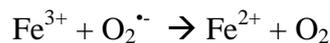
Lors de son cycle intraérythrocytaire, le parasite est soumis à un environnement riche en oxygène et en fer, propice au stress oxydant.(381) En effet, comme vu précédemment, lors de la digestion de l'hémoglobine, la libération d'hème libre est accompagnée de la production de radicaux superoxydes ($O_2^{\cdot-}$) qui se dismutent rapidement en peroxyde d'hydrogène, par une réaction catalysée impliquant une superoxyde dismutase(382) :



Il faut noter que les radicaux superoxydes ne sont pas capables de traverser les membranes cellulaires contrairement au peroxyde d'hydrogène.(382) Le peroxyde d'hydrogène formé peut ensuite réagir avec les espèces Fe^{II} présentes dans le globule rouge par une réaction de type Fenton , formant ainsi des radicaux hydroxyles(382) (HO^{\cdot}) :



Le Fe^{2+} est ensuite régénéré(382) par action du radical superoxyde $O_2^{\cdot-}$:



Une réaction de type Haber-Weiss peut avoir lieu entre le peroxyde d'hydrogène et le radical superoxyde, formant ainsi des radicaux de type hydroxyles.(382)

Dans les globules rouges sains, ces processus s'équilibrent grâce aux systèmes anti-oxydants en présence.(383) Dans les globules rouges parasités en revanche, un surplus de radicaux est produit engendrant un déséquilibre entre les espèces pro et anti-oxydantes.(381) Les systèmes de détoxification présents à la fois chez le parasite mais également chez la cellule hôte, sont accélérés afin de contrer ces espèces radicalaires et créer un nouvel équilibre rédox. De nombreuses études(190) se sont intéressées à la compréhension des mécanismes antioxydants, permettant l'identification d'antioxydants et d'enzymes intervenant dans la détoxification du parasite et de la cellule hôte.

Dès le début de la digestion de l'hémoglobine, ces processus vont engendrer la mise en place du système de détoxification. Parmi les systèmes mis en place, le parasite et la cellule hôte possèdent des enzymes antioxydantes (et leurs substrats) et des molécules antioxydantes de plus petit poids moléculaire, le glutathion (GSH) et la thioredoxine (TrxSH₂).⁽¹⁹⁰⁾ Le GSH est un tripeptide (γ -L-Glutamyl-L-cystéinyglycine) thiol présent en grande quantité dans toutes les cellules de mammifères.⁽³⁸²⁾ La TrxSH₂ est une petite protéine impliquée dans la réduction de peroxydase et de ribonucléotides et dans la défense antioxydante.⁽¹⁹⁰⁾ De plus, elle protège des dommages oxydatifs et inhibe l'apoptose.⁽³⁸⁴⁾ Malgré des systèmes de défense antioxydants complexes, il a été montré que les érythrocytes parasités par *P. falciparum* produisent des espèces radicalaires alors que les érythrocytes sains non.^(385–387) Ceci a été réalisé par microscopie confocale, grâce à l'utilisation de la sonde fluorescente 2',7'-dichlorofluorescéine diacétate.⁽³⁸⁷⁾ Cette sonde pénètre dans les cellules puis s'accumule dans le cytosol où elle est tout d'abord déacétylée par une estérase en dichlorofluorescéine. Les radicaux présents dans le milieu réagissent ensuite sur ce produit non fluorescent pour former la dichlorofluorescéine desestérifiée. Ce produit final fluoresce à 530 nm (excitation à 514 nm). Cette sonde permet la détection de divers ROS tels que RO[•], ROO[•], HO[•], et NO[•]. Néanmoins, il est important de noter que de telles sondes permettent de mettre en évidence la production de ROS sans toutefois spécifier leur nature exacte à l'intérieur du parasite.

Toutes ces observations ont conduit à étudier les propriétés rédox de la FQ. En effet, l'existence de H₂O₂ dans la vacuole digestive du parasite, dont la concentration locale est estimée à 15 mM^(190, 388) est particulièrement intéressante du fait de la présence de l'atome de Fe^{II} dans la FQ. En effet, comme pour le couple Fe^{II}/Fe^{III}, il a été montré qu'en conditions oxydantes proches de celles de la vacuole digestive, la FQ est capable d'engendrer des réactions de type Fenton conduisant à la production de radicaux hydroxyles⁽³⁸⁹⁾ :



Cette production de radicaux hydroxyles pourrait contribuer à l'activité antipaludique de la FQ. En effet, ces radicaux sont connus pour les graves dommages qu'ils provoquent sur toutes les molécules biologiques, en particulier la peroxydation des acides gras polyinsaturés.⁽³⁹⁰⁾

Comparativement, la CQ pourrait induire la production de ROS dans les cellules astrogliales, induisant l'activation du facteur nucléaire NFκB (impliqué dans les mécanismes pro-apoptotiques).(391) Néanmoins, il a été montré que la CQ n'est pas capable de produire des radicaux hydroxyles en présence de peroxyde d'hydrogène au pH vacuolaire alors que dans les mêmes conditions expérimentales, la FQ en produit à des concentrations micromolaires.(389) Il a été suggéré que la faible proportion de radicaux hydroxyles ne devraient pas affecter la stabilité de la FQ mais devrait être suffisante pour déplacer le fragile équilibre rédox de la vacuole digestive.

II.1.5.4.1.5.2.7.4. Structures de la FQ

Les structures des formes neutre et diprotonée de la FQ ont été étudiées par cristallographie des rayons X.(364) Sous sa forme neutre la FQ est stabilisée par une liaison hydrogène intramoléculaire de 2,95Å entre l'atome d'hydrogène porté par l'azote en position 11 et l'azote en position 24 (*Figure 33*).

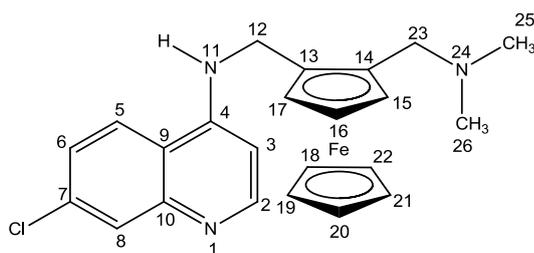


Figure 33 : numérotation de la FQ

En revanche sous sa forme diprotonée, cette distance devient 4,07 Å en raison des répulsions électrostatiques entre l'atome d'azote 24 chargé et l'atome d'azote 11 partiellement chargé. Il a été suggéré que l'interaction de l'une de ces formes avec l'hématine serait responsable du mécanisme d'action de la FQ.(364)

D'autre part, il avait été suggéré que l'accumulation serait liée aux propriétés de base faible de la FQ. Afin de mesurer l'influence des pK_a de la FQ sur son activité, différents groupements alkyles ont été introduits sur l'azote 11. La présence d'un substituant sur cette position empêche le transfert de proton de la position 1 à la position 11 et également la possibilité de formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire. L'introduction d'un substituant en position 11 engendre une augmentation de la lipophilie (plus le substituant est volumineux, plus la lipophilie augmente) des molécules et une légère variation des pK_a des amines 24 et 11. De plus, cette substitution engendre

une diminution de l'activité antipaludique par rapport à la FQ. Il a été suggéré que ces molécules seraient trop lipophiles et qu'elles resteraient « piégées » dans la membrane vacuolaire, empêchant ainsi toute interaction avec l'hématine. La lipophilie et la liaison hydrogène intramoléculaire seraient essentielles à l'activité antipaludique puisqu'elles pourraient permettre au groupement hydrophobe ferrocénique de se placer au niveau des lipides de la membrane vacuolaire rendant accessible le cycle quinoléine pour son interaction avec la porphyrine et ainsi inhiber la formation de l'hémozoïne.

De manière tout à fait intéressante, pour cette étude, aucune relation directe n'a été trouvée entre l'activité antipaludique et le niveau d'inhibition de formation de l'hémozoïne de ces molécules. Ce qui suggère que l'activité de la FQ ne serait pas uniquement due à cette propriété. Cependant, les meilleurs inhibiteurs de la formation de l'hémozoïne sont les molécules les plus actives. D'autre part, le coefficient d'accumulation vacuolaire de ces molécules a été déterminé selon l'équation : $VAR = 10^{(\log D_{7.4} - \log D_{pH})}$. Aucune relation n'a pu être établie entre le VAR et l'activité de ces molécules, laissant supposer que l'accumulation des molécules dans le compartiment vacuolaire ne serait pas déterminant dans l'activité de ces molécules. Il faut néanmoins rester prudent sur ces conclusions puisque le calcul du VAR comporte des approximations.

Le mécanisme d'action de la FQ semble être multifactoriel et différent de celui de la CQ. Des études supplémentaires seront nécessaires pour élucider la compréhension globale de son mécanisme d'action, principalement sur la localisation de son site d'action.

II.1.5.4.2. L'apicoplaste

II.1.5.4.2.1. Généralités

Dès les années 60, un organite possédant plusieurs membranes a été observé chez *Eimeria* puis chez *Plasmodium spp*, on pensait à l'époque qu'il s'agissait de la mitochondrie ou de la vacuole digestive.(392–394) Dans les années 70, cet ADN a été décrit pour la première fois chez *P. knowlesi*, sa taille a été estimée à 35 kDa et a été identifié comme un ADN mitochondrial.(395, 396) Plus tard, un ADN extrachromosomal circulaire de 35 kDa a été observé chez *Plasmodium lophurae* (un *Plasmodium* infectant les oiseaux).(397) L'origine mitochondriale a été remise en question lorsque l'analyse des génomes de *P. yoelii*, *P. chabaudi*, *P. berghei*, *P. cynomolgi*, *P. knowlesi* et *P. falciparum*(398) a révélé l'identification d'un ADN de 6 kDa (donc différent de celui de 35 kDa), possédant les caractéristiques d'un ADN mitochondrial. Après de nombreux efforts de

séquençage, cet ADN a été reconnu comme étant distinct de celui du noyau(399) et de celui de la mitochondrie(400). Les différentes études ont permis de révéler les similitudes de cet ADN avec le génome des plastes, notamment de plastes non synthétiques tel que *Epifagus virginiana* et d'algues telles que *Astasia longa*. En effet, les gènes des sous-unités du complexe ribosomal sont organisés sous forme de deux secteurs répétés inversés, ce qui est caractéristique des ADN de chloroplastes.(401–404) Cependant, il faut noter que cet ADN ne porte pas de gènes impliqués dans la photosynthèse.

La collaboration de parasitologues et de botanistes a conduit à la localisation de cet ADN circulaire dans le parasite.(12, 405) Un gène de l'ARN ribosomal proche de celui des plastes, avait été isolé chez *T. gondii*.(406) Cet ARN ribosomique a été marqué puis utilisé comme sonde dans des expériences d'hybridation *in situ* de coupes ultrafines de *T. gondii*.(403) Il est à noter que *T. gondii* a été choisi car dans sa forme tachyzoïte, il existe huit copies du génome circulaire de 35 kDa du parasite alors qu'il n'y en a qu'une chez *Plasmodium spp.*(11) L'analyse des résultats a permis de montrer que seul un petit organe de forme ovoïde avait été marqué par cet sonde. Ces expériences ont permis de démontrer clairement que l'ADN circulaire de 35 kDa était situé dans la structure sub-cellulaire de ce petit organe ovoïde. De plus, comme dans le cas des plantes et des algues rouges et vertes, l'organe serait délimité par plusieurs membranes (quatre chez *Plasmodium*(407)). Chaque parasite contient une mitochondrie et un organe ovoïde, comme dans le cas des algues. Environ une année plus tard, ces résultats furent confirmés et la fusion des mots « apicomplexe » et « plaste » a donné lieu à la naissance du mot « apicoplaste ».(11)

II.1.5.4.2.2. Origine de l'apicoplaste

Les processus de l'évolution qui ont conduit à la formation de l'apicoplaste ont été étudiés. Il a été montré que l'origine de l'apicoplaste provient d'un scénario à deux étapes.

Tout d'abord, un phénomène d'endosymbiose simple (*Figure 34*) a permis aux cellules primitives d'acquérir des organites contenant de l'ADN (chloroplastes ou mitochondrie). Toutes les mitochondries présentes dans les cellules eucaryotes proviennent de l'endosymbiose primaire d'une alpha-protéobactérie dans une cellule primitive.(408) Les chloroplastes primaires sont quant à eux issus de l'endosymbiose primaire d'une cyanobactérie ancestrale dans une cellule. Les deux membranes de l'enveloppe mitochondriale proviennent donc des deux membranes de l'alpha-

protéobactérie et les deux membranes de l'enveloppe chloroplastique proviennent des deux membranes de la cyanobactérie ancestrale.(408)

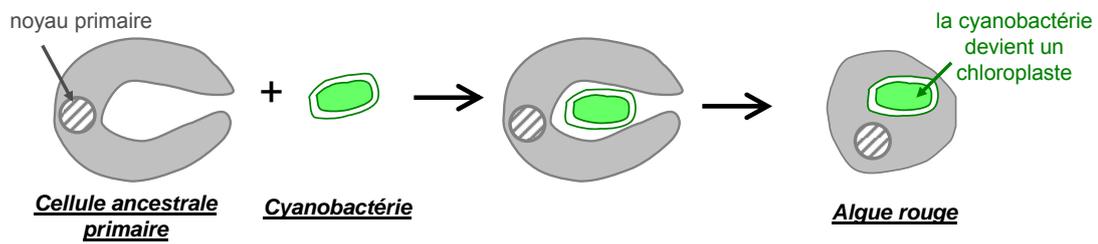


Figure 34 : Première étape de la formation de l'apicoplaste : Endosymbiose primaire à l'origine des algues rouges.(409)

Les protistes proviennent de l'endosymbiose secondaire (*Figure 36*) d'une algue par un eucaryote secondaire. Des algues rouges ou des algues vertes pouvant être impliquées. Il a été montré que l'apicoplaste provient de l'endosymbiose d'une algue rouge.(410) Au cours de l'évolution, cette endosymbiose secondaire a été suivie de la disparition des structures subcellulaires inutiles et de la consolidation des liens métaboliques. La seule structure membranaire conservée de l'algue est un plaste réduit limité par quatre membranes (*Figure 35*).

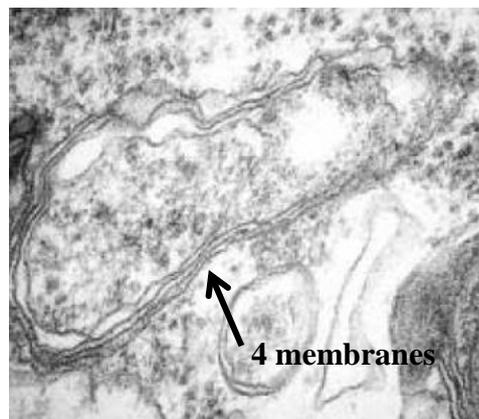


Figure 35 : Structure de l'apicoplaste(407)

Enfin, un transfert génétique de l'ADN du noyau et du plaste vers le noyau de l'hôte secondaire a été effectué, ce qui a engendré la présence de protéines algales chez *Plasmodium*.(411)

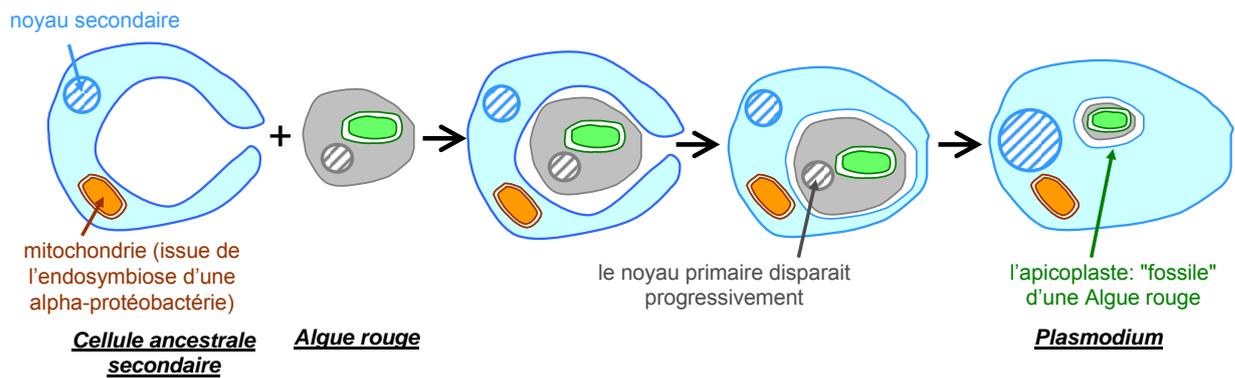


Figure 36 : Deuxième étape de la formation de l'apicoplaste : Endosymbiose secondaire à l'origine des apicomplexes.(409)

II.1.5.4.2.3. Rôle vital de l'apicoplaste

Les protéines algales du parasite, absentes chez l'Homme, présentent une cible potentielle dans le développement de nouvelles molécules antiparasitaires. Néanmoins, le rôle vital de l'apicoplaste pour le parasite a dû être prouvé avant tout étude.

Le rôle vital de l'apicoplaste a été clairement démontré grâce à l'effet létal des antibiotiques sur les formes sanguines de *P. falciparum*. Il a été montré que les antibiotiques, tels que la doxycycline, sont capables d'inhiber la transcription de l'ADN ou la traduction de l'ARN, et plus particulièrement en bloquant l'expression du génome de l'apicoplaste.(412, 413) Les parasites traités ne montrent aucune anomalie évidente au cours du premier cycle de vie du parasite : la morphologie des organites, la réplication du génome, le ciblage des protéines et la ségrégation restent intacts durant la division cellulaire. C'est pourquoi, les chercheurs s'attendaient à ce que les parasites se développent normalement et passent par les différents stades de développement : anneaux, trophozoïtes, schizontes et mérozoïtes. Les parasites étant ainsi capables d'envahir à nouveau une nouvelle cellule hôte. Au lieu de cela, un phénotype de « mort cellulaire décalée » ou « mort retardée » a été observé, c'est-à-dire que les effets délétères, provoqués par l'administration d'antibiotiques, s'accumuleraient dans la descendance des parasites traités. Après un traitement antibiotique, lors du deuxième cycle de vie du parasite, le génome de l'apicoplaste ne se réplique plus. Les fonctions d'importation de protéines sont ainsi perdues et l'organite n'est plus capable de se reproduire durant la division cellulaire. En effet, les parasites apicomplexes se divisent avec des processus très variés (Figure 37), au cours desquels il peut y avoir division des noyaux avant division des cellules. Dans tous les cas, la division de la mitochondrie et celle de l'apicoplaste sont coordonnées de sorte que les cellules ne présentent qu'un seul exemplaire de ces organites. De plus,

le parasite n'étant pas capable de générer l'apicoplaste *de novo*, l'absence de réplication et de ségrégation engendre donc la perte de l'apicoplaste dans les cellules filles et la mort du parasite. Généralement, l'effet de mort retardée, causé par l'administration d'antibiotiques, commence par une inhibition spécifique de la transcription et de la traduction dans l'apicoplaste et se termine avec une perte irréversible de cet organite puis à la mort du parasite dans le cycle suivant. Ces observations ont été également faites lors de l'étude de lignées de *T. gondii* présentant des défauts dans la ségrégation de l'apicoplaste. En effet, après division, les cellules filles possédant un apicoplaste sont capables de survivre alors que les cellules filles privées d'apicoplaste engagent une nouvelle division puis meurent.(405, 414) Ce phénomène a été retrouvé également chez *Plasmodium*.(415)

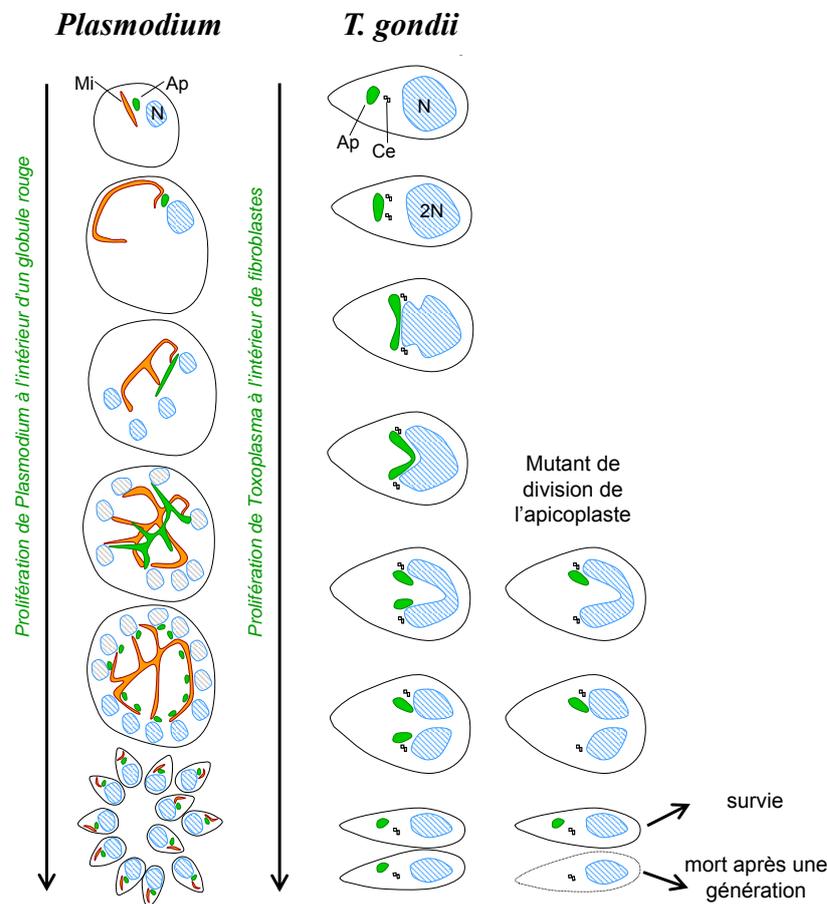


Figure 37 : Synchronisation de la division de l'apicoplaste et de la multiplication cellulaire chez *Plasmodium* et *T. gondii*.(409)

II.1.5.4.2.4. Fonctions biologiques de l'apicoplaste chez *Plasmodium*

II.1.5.4.2.4.1. Biosynthèse des isoprénoïdes : Voie des DOXP

Les isoprénoïdes constituent une classe importante de molécules lipidiques. Ces molécules sont des précurseurs essentiels pour la synthèse des stérols, de la chlorophylle, et des quinones. Ils peuvent également être nécessaires à l'ancrage des protéines dans les membranes, soit directement via la prénylation des protéines (modification post-traductionnelle, qui consiste en la fixation covalente des groupes prényles hydrophobes à des protéines d'ancrage spécifiques sur une membrane biologique cible) ou indirectement par l'intermédiaire des ancras glycosylphosphatidylinositol (GPI).(416) Les isoprénoïdes peuvent également agir comme groupe prosthétique des ARNt dans les plastes et les mitochondries. Tous les isoprénoïdes proviennent de la combinaison de précurseurs, composés d'unités répétitives de chaînons à cinq carbones : l'isopenténylpyrophosphate (IPP) et le diméthylallylpyrophosphate (DMAPP).(416) Ces deux précurseurs peuvent être synthétisés soit par l'intermédiaire d'une voie mévanolate, présente dans les cellules animales et dans le cytosol de plantes ; soit par l'intermédiaire d'une voie 1-désoxy-D-xylulose-5-phosphate (DOXP), présente chez les bactéries et les plastes.(417) Peu de temps après sa découverte, l'apicoplaste a été considéré comme un site indispensable et unique dans la voie de biosynthèse des précurseurs isoprénoïdes chez *P. falciparum*, notamment grâce à une voie DOXP.(418, 419) La voie DOXP suscite un grand intérêt du fait de sa présence dans tous les apicomplexes, à l'exception de *Cryptosporidium spp.* qui ne possède pas d'apicoplaste.(420) De plus, les perturbations moléculaires et chimiques de cette voie peuvent engendrer la mort du parasite, ce qui la rend très attractive comme cible thérapeutique. Une étude récente (421) a permis de montrer que lors du stade érythrocytaire, la voie DOXP serait la seule fonction essentielle de l'apicoplaste chez *P. falciparum*.

L'utilisation de la fosmidomycine et d'autres inhibiteurs a permis de confirmer le rôle essentiel de la voie DOXP pour les apicomplexes.(416) Cependant, le rôle des précurseurs d'isoprénoïde IPP et DMAPP, synthétisés par la voie DOXP, reste encore à élucider. Néanmoins, quelques données permettent d'expliquer la fonction de la voie DOXP.

La prénylation des protéines intervient dans l'incorporation du précurseur IPP de l'apicoplaste. Les groupements prényles sont formés par la répétition de monomères IPP liés, formant des groupes géranylpyrophosphate (geranylPP, à 10 atomes de carbone), des groupes farnésylpyrophosphate (farnesylPP, à 15 atomes de carbone) et des groupes géranylgeranylpyrophosphate (geranylgeranylPP, à 20 atomes de carbone). La fixation des groupes prényles est catalysée par 3 types de transférases.(422) Les petites GTPases impliquées dans le développement du cancer, exigent une prénylation des protéines pour un ciblage correct de la

membrane.(422) De nombreux inhibiteurs de prényl-transférase ont été testés lors d'essais cliniques avancés dans le traitement de différentes formes de cancer. Certaines de ces molécules ont ensuite été testées avec succès en tant qu'inhibiteurs potentiels de prényl-transférases chez *P. falciparum* et *T. gondii*.(422, 423) Bien que ces données montrent l'importance des groupes prényles et des phénomènes de prénylation, il n'existe actuellement aucune preuve directe de l'implication de la voie DOXP dans la genèse des groupements prényles. Le dolichol est une structure polyprénylique utilisée comme transporteur de polysaccharides pour la synthèse des glycoprotéines dans le réticulum endoplasmique. Dans les apicomplexes, le dolichol serait utilisé dans la glycosylation des protéines d'adhésion de surface et dans la synthèse des ancres GPI.(410, 419, 424) Les deux protéines d'adhésion de surface et les protéines GPI ancrées sont fortement représentées sur la membrane plasmique du parasite. Leurs structures et leurs voies de biosynthèse seraient hautement conservées dans les parasites apicomplexes.(424) La plupart de ces protéines seraient impliquées dans les processus d'adhésion et d'invasion du parasite dans la cellule hôte et pourraient donc être nécessaires à la survie du parasite.(424, 425) Lors du stade sanguin, et plus précisément au cours des stades anneau et schizonte, la synthèse du dolichol est inhibée par la fosmidomycine chez *P. falciparum*.(426) Ces résultats indiquent que la voie DOXP pourrait fournir les précurseurs de la biosynthèse du dolichol. Néanmoins, il n'a pas encore été prouvé que l'apicoplaste soit le site de cette synthèse.

La mitochondrie pourrait également nécessiter la synthèse d'IPP. En effet, les chaînes de transport d'électrons dans la mitochondrie possèdent des transporteurs d'électrons essentiels, seulement actifs lorsqu'ils sont polyprénylés. L'ubiquinone (ou co-enzymeQ), qui est le principal transporteur d'électrons de la chaîne mitochondriale, est synthétisé au cours du stade sanguin chez *P. falciparum*.(427) La fosmidomycine est également capable d'inhiber sa synthèse.(426) Dans des conditions anaérobies, *P. falciparum* pourrait synthétiser et utiliser la ménaquinone comme transporteur polyprénylé alternatif d'électrons.(428) La synthèse de la ménaquinone est bloquée par un inhibiteur mycobactérien, le Ro 48-8071 (*Figure 38*). Ce composé est capable de tuer *P. falciparum* avec une CI_{50} de l'ordre du micromolaire.(428) La perturbation des phénomènes de translocation (échange de matériel chromosomique entre des chromosomes non homologues) chez *T. gondii* entraînerait une chute importante du potentiel de la membrane mitochondriale, c'est à dire de son état énergétique.(429) Cela pourrait constituer une preuve indirecte de la perturbation de la voie DOXP, qui déclencherait un arrêt de la synthèse de l'ubiquinones ou de la ménaquinone, bloquant ainsi la production d'ATP dans les mitochondries.(430) Cependant, des études supplémentaires seront nécessaires pour relier ces deux voies.

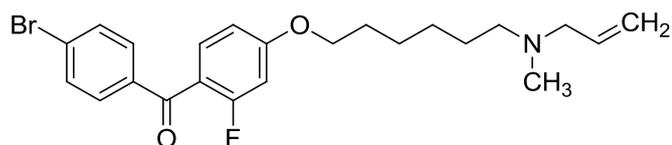


Figure 38 : Formule du Ro 48-8071(431)

L'isopenténylation des ARNt est une modification qui permet une bonne liaison du complexe ribosome-ARNm. Ce processus agirait en perturbant les phénomènes de traduction des génomes mitochondrial et apicoplastique (419) et la réaction de transfert de la DMAPP en adénosine, sur la boucle anticodon, serait catalysée par une isoprenyltransférase. Un homologue d'une isoprenyltransférase de plante a été trouvé *in silico* dans l'apicoplaste de *P. falciparum*.(419) Néanmoins, expérimentalement, il n'a pas été montré que cette modification cruciale soit dépendante de la voie DOXP chez l'apicoplaste. Toutefois, il faut noter que la complémentation en DMAPP de cultures de *P. falciparum*, traitées par de la fosmidomycine, ne permet pas la survie des parasites.(421) Ceci suggère que le DMAPP ne serait pas capable d'atteindre l'apicoplaste pour réaliser l'isopenténylation ou que le DMAPP n'est pas nécessaire à cette voie métabolique.

Récemment, il a été montré que la phytohormone ABA (acide abscissique, Figure 39) jouerait un rôle majeur dans les mécanismes cellulaires dépendantes du calcium chez *T. gondii*.(432) Chez les plantes, l'ABA est synthétisée à partir des précurseurs de caroténoïde par la voie DOXP. Chez *T. gondii* l'ajout d'ABA exogène induirait une sécrétion calcium-dépendante des protéines et déclencherait ainsi la sortie du parasite.(432)

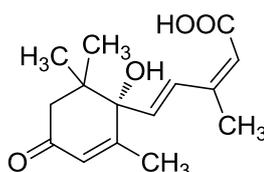


Figure 39 : Formule de l'acide abscissique

De plus, l'utilisation de la fluridone (Figure 40), un herbicide inhibant la synthèse de l'ABA, induirait le développement de kystes mais protégerait les souris contre la toxoplasmose.(432)

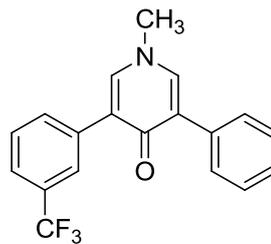


Figure 40 : Formule de la Fluridone

La présence d'ABA endogène dans le parasite a été confirmée par HPLC et GC-MS. Cependant, malgré la présence de gènes répondant à l'ABA chez *T. gondii* et *P. falciparum*, les gènes responsables de la synthèse d'ABA ne sont pas clairement identifiés. Il a été suggéré qu'un marquage métabolique de l'IPP plastidial pourrait révéler leur incorporation dans l'ABA, confirmant ainsi le rôle de l'apicoplaste comme source principale des précurseurs de l'ABA. Les algues sont connues pour engendrer la production d'ABA, mais cette voie n'a pas encore été caractérisée. L'origine algale de l'apicoplaste pourrait expliquer la difficulté d'identification des protéines responsables de la synthèse de l'ABA dans cet organe. Des expériences de marquage métabolique et d'inhibition parasitaire par le norflurazon, un herbicide connu bloquant spécifiquement la synthèse des caroténoïdes, ont permis de prouver que les caroténoïdes sont synthétisés lors du stade sanguin de *P. falciparum*.(433) La phytoène synthétase a été identifiée et caractérisée à partir du génome de *P. falciparum*. Cette enzyme serait impliquée dans les mécanismes de synthèse des caroténoïdes. Il a également été suggéré que les caroténoïdes joueraient un rôle anti-oxydant dans la membrane du parasite. Ces différentes études démontrent l'origine algale et la polyvalence des apicomplexes pour adapter les voies existantes pour de nouvelles utilisations.

II.1.5.4.2.4.2. Biosynthèse des acides gras

Les acides gras sont des molécules essentielles pour toutes les cellules. En effet, ils sont les éléments constitutifs des membranes cellulaires et jouent un rôle important dans la signalisation cellulaire. La voie de type II de la synthèse des acides gras (FASII) est l'une des 4 voies (les autres étant la biosynthèse FASI, la voie d'élongation des acides gras du réticulum endoplasmique et la séquestration cellule hôte) employées par les parasites apicomplexes pour satisfaire leurs besoins en lipides. La voie de biosynthèse FASII a suscité un grand intérêt depuis une vingtaine d'années.(416) En effet, cette voie localisée dans l'apicoplaste est absente chez l'hôte mammifère, de plus les premières investigations ont suggéré que la biosynthèse FASII était essentielle à la survie du

parasite, notamment au stade sanguin.(434, 435) Désormais, il est admis que ces conclusions ne sont plus valables. Néanmoins, l'intérêt pour cette voie reste encore élevée car la voie FASII semble indispensable au développement des mérozoïtes au stade hépatique.(436) Ce complexe multi-enzymatique offre de multiples cibles pour les médicaments antipaludiques. Des expériences de radiomarquage dans des érythrocytes infectés par *P. falciparum* ont montré que les acides gras ne sont pas synthétisés *de novo*. En effet, les lipides contenus dans les globules rouges de l'hôte seraient séquestrés par le parasite en développement.(437) Cependant, la découverte de l'apicoplaste(11, 12, 403) a permis de montrer que comme dans le cas des plastes de plantes et d'algues, l'apicoplaste contient des mécanismes pour la biosynthèse *de novo* des acides gras chez *P. falciparum*(419, 438), *T. gondii*(438), et *Eimeria tenella*(439), réfutant ainsi cette hypothèse. Désormais, il est admis que cette voie est essentielle pour *Plasmodium spp* et *T. gondii*, mais des questions subsistent quant au rôle exact de ces mécanismes dans la survie du parasite.

La plupart des études biochimiques de la voie FASII chez les apicomplexes ont été réalisées chez *T. gondii*. Dans des expériences similaires à celles effectuées chez *P. falciparum* (435), l'incorporation de l'¹⁴C-acétate dans les acides gras intracellulaires et extracellulaires présents chez *T. gondii* a été observée dans les lipides acylés (glycéro- et sphingolipides) à seize ou dix-huit carbones.(440) Le marquage peut être éliminé par addition d'haloxyfop, un inhibiteur de l'acétyl-CoA carboxylase (ACCase, enzyme qui catalyse la synthèse des lipides)(441), ce qui suggère que la voie FASII pourrait fournir le parasite en acides gras en C16 et C18 pour la synthèse de lipides variés. Cependant, des études récentes ont mis en doute cette théorie en montrant qu'un knock-down d'ACP (protéine qui transporte les fonctions acétyles) chez *T. gondii* n'affecte pas l'incorporation de l'¹⁴C-acétate.(442) Ceci indique que l'incorporation de l'¹⁴C-acétate serait indépendante de la voie FASII et qu'elle pourrait être réalisée via la voie FASI cytosolique ou via le système d'élongation lipidique du réticulum endoplasmique. En outre, la source d'acétyl-CoA de l'apicoplaste proviendrait de la conversion du pyruvate par un complexe pyruvate déshydrogénase (PDH) présent exclusivement dans l'apicoplaste (443), c'est pourquoi le marquage avec l'¹⁴C-acétate ne pourrait pas suivre la voie directe des précurseurs acétyles de FASII.

Bien qu'elle ne semble pas essentielle à la production de groupements lipides chez *T. gondii*, FASII serait essentielle pour la biogenèse et le développement de l'apicoplaste(440, 442), notamment pour la synthèse des lipides utilisés dans la croissance et la division membranaire de l'apicoplaste.(444) L'acide phosphatidique (PA) est un précurseur essentiel pour la biosynthèse d'autres glyco- et / ou glycérolipides qui jouent un rôle crucial dans l'intégrité de la structure de la

membrane et dans la signalisation cellulaire. Dans le plaste, PA et son produit d'hydrolyse, le diacylglycérol (DAG) sont des intermédiaires clés dans la production des glycérolipides : le monogalactosyldiacylglycérol (MGDG), le digalactosyldiacylglycérol (DGDG) et le phosphatidylglycérol (PG).(445) Il serait donc possible que ces lipides jouent un rôle crucial dans le maintien de l'intégrité du plaste. Chez *T. gondii*, FASII pourrait conduire à la production de PA et donc potentiellement à la synthèse de MGDG, DGDG et PG.(440) Bien que l'incorporation de l'acétate observé n'est pas montré de dépendance à la voie FASII(442), la chaîne acyle de PA localisée dans l'apicoplaste, semble pourtant être dérivée de FASII. PA pourrait également être synthétisé à partir d'acyl-CoA dans le réticulum endoplasmique par la glycérol-phosphate acyltransférase, qui a été caractérisée chez *P. falciparum* (446) et par action ultérieure de la lyso-acide phosphatidique acyltransférase, présente chez *T. gondii* et *P. falciparum*.(440, 447) Cela pourrait aboutir à la synthèse de PA à partir de précurseurs dérivés de FASI (ou d'une autre voie), différente de la voie FASII.

En outre, FASII est nécessaire à *T. gondii* et *P. falciparum* pour la production *de novo* de l'acide lipoïque et pour la lipoylation de la PDH, le complexe enzymatique responsable de la production du précurseur de la voie FASII, l'acétyl-CoA (442, 448, 449). Dans l'apicoplaste, la lipoylation se produit par fixation covalente d'octanoyle-ACP (un produit de FASII) à l'apo-E2 (transacylase), une sous-unité de la PDH, par action de la LiPb. Chez *P. falciparum* uniquement, la lipoylation est produite par la LplA2 (449–451) et par une insertion postérieure de résidus soufrés sur les positions C6 et C8 par la LiPa.(452) Bien que LipB et LplA2 ne soient pas essentielles lors du stade érythrocytaire (449), LiPa semble quant à elle nécessaire à *P. falciparum* (453), probablement parce que l'acide lipoïque ne peut pas entrer dans l'apicoplaste.(454) La nature essentielle des mécanismes de lipoylation dans l'apicoplaste peut paraître surprenante étant donné que la protéine lipoylée présentée ici est un générateur de précurseur de la voie de FASII et que l'acide lipoïque libre est présent dans cet organite à des niveaux négligeables.(453, 455) Il a été suggéré que la protéine liée à l'acide lipoïque pourrait agir comme donneur d'électrons et ainsi permettrait la détoxification des espèces réactives de l'oxygène présentes dans l'apicoplaste (456).

Toutes ces études montrent que le caractère essentiel de la voie FASII serait essentiellement due à son rôle dans la biogénèse des membranes plastidiales et dans la production de l'acide lipoïque. FASII possède également d'autres rôles, non essentiels, notamment dans la production de groupements lipides et dans la production de l'acide phosphatidique qui joue un rôle dans la signalisation cellulaire et agit aussi comme un précurseur essentiel de la production des

lipides(440). L'importance de la voie FASII peut également être dépendante de la disponibilité des éléments nutritifs, de l'interaction avec l'hôte et du stade du cycle de vie.

II.1.5.4.2.4.3. Synthèse des centres Fer-Soufre

Les centres fer-soufre, également appelés « clusters [Fe-S] » résultent de l'assemblage d'ions sulfures, dits soufres inorganiques, et d'atomes de fer dans différents états d'oxydation (Fe^{2+} ou Fe^{3+}). (457) Ces centres métalliques peuvent être contenus dans des protéines présentes dans tous les organismes vivants. Les protéines [Fe-S] peuvent intervenir dans des processus de transfert d'électrons (environ 50% des protéines décrites), la régulation génique, la catalyse rédox ou non rédox, le maintien de la structure protéine ou encore dans les chaînes respiratoires ou photosynthétiques. (457, 458)

Chez les eucaryotes, il avait été suggéré que la biosynthèse des centres [Fe-S] était exclusivement située dans la mitochondrie, ces conclusions ont été revues lorsque des enzymes et protéines spécifiques ciblant l'apicoplaste(459) ont été découvertes chez *Arabidopsis thaliana* et *P. falciparum*. (459–462) Chez *P. falciparum*, les protéines ferredoxine (Fd), IspG, et IspH (impliquées dans la biosynthèse des isoprénoïdes), et les enzymes LipA (acide lipoïque synthase) et MiaB (tRNA méthylthiotransférase) ciblent l'apicoplaste et requièrent la présence de centres [Fe-S] pour se fixer. (463)

L'importation des centres [Fe-S] de la mitochondrie vers l'apicoplaste semble improbable, c'est pourquoi la voie de biogénèse de ces clusters existerait de façon indépendante dans la mitochondrie et dans l'apicoplaste. (407, 419, 462). Chez *Plasmodium*, l'étude du protéome de l'apicoplaste a permis d'identifier les différentes protéines impliquées dans la synthèse des centres [Fe-S], notamment SufB et Orf470 codées par le génome de l'apicoplaste et NIFU, SufA, SUFC, SufD et SufS codés par le génome nucléaire du parasite. (407, 419, 459, 462)

Actuellement, aucune étude n'a permis de montrer que l'une des voies de synthèse des centres [Fe-S] est essentielle aux processus de maturation des protéines de l'apicoplaste, la démonstration de leur rôle dans d'autres processus, pourrait démontrer l'importance de ces voies. (410) D'autre part, il a été suggéré que la perturbation des équilibres d'oxydoréduction dépendant de ces voies, par interférence pharmacologique, devrait tuer le parasite. (410)

II.1.5.4.2.4.4. Synthèse de l'hème

Dans de nombreux organismes vivants, comme les animaux ou les champignons, l'hème est un produit final de voie de biosynthèse des tétrapyrroles et un groupe prosthétique important pour de nombreuses protéines, telles que les cytochromes. Chez les plantes, la voie de biosynthèse des tétrapyrroles conduit à la formation de l'hème et de la chlorophylle. Chez *Plasmodium*, l'hème toxique provenant de la digestion de l'hémoglobine est neutralisée par biocristallisation en hémozoïne. Malgré cette voie de détoxification, le parasite synthétise de l'hème *de novo*. En effet, il a été montré que la synthèse des protéines du parasite est hème-dépendante et que cette voie est une cible thérapeutique potentielle.(464) D'autre part, l'inhibition de cette voie de biosynthèse engendrerait la mort du parasite par suppression des fonctions d'auto-subsistance de l'apicoplaste ou de subsistance de l'organisme dans son ensemble. Néanmoins, il semble essentiel de noter que l'intégralité de la voie de biosynthèse de l'hème est partagée entre l'apicoplaste et la mitochondrie. Le cytoplasme serait un compartiment intermédiaire, permettant les échanges entre le plastide et la mitochondrie.(419, 465) Il a été suggéré que le processus d'endosymbiose secondaire à l'origine de l'apicoplaste aurait donné lieu à une fusion des deux voies de biosynthèse de l'hème, engendrant la création d'une voie hybride inhabituelle.(407, 419)

II.1.5.4.2.4.5. Processus moléculaires

II.1.5.4.2.4.5.1. Réplication de l'ADN

Lors de la formation des mérozoïtes (étape de schizogonie), les réplifications des génomes nucléaire et apicoplastique sont simultanées.(466) Le génome de l'apicoplaste ne code pour aucune des protéines impliquées dans la réplication de l'ADN.(467) C'est pourquoi, la machinerie de réplication de l'ADN doit être importée à partir de gènes codés par le noyau. C'est le cas du facteur de réplication PfPrex (*Plasmodium falciparum* plastidic DNA replication enzyme complex) qui est codé par le noyau, mais est destiné à l'apicoplaste.(468) Il a été montré qu'une forme recombinante du domaine de l'ADN primase de PfPrex est capable de transcrire l'ARN primaire à partir d'une matrice d'ADN simple brin.(469) L'inhibition des fonctions enzymatiques de PfPrex devrait constituer une cible intéressante pour le développement de médicaments.

D'autres protéines codées par le noyau, ciblant l'apicoplaste, ont également été identifiées comme des cibles potentielles pour la conception de médicaments. Par exemple, les topoisomérases de type II, appelées ADN gyrases (470), sont des isomérases agissant sur la topologie de l'ADN.(471) Chez *P. falciparum*, les gènes codant pour les sous-unités GyrA et GyrB de la gyrase présentent deux séquences principales ciblant l'apicoplaste.(472, 473) De plus, au moins la sous-unité GyrB serait localisée dans l'apicoplaste.(473) La sous-unité GyrA contient les domaines de

clivage et d'enroulement de l'ADN, tandis que la sous-unité GyrB contient les domaines ATPase et topoisomérase-primase, présentant une forte homologie avec leurs homologues présents chez *E. coli*.(473) La novobiocine qui inhibe l'activité de l'ATPase de la GyrB dans *E. coli*(474), a montré une activité spécifique et compétitive d'inhibition de l'ATPase de l'apicoplaste et de la réplication de l'ADN de *P. falciparum*, conduisant à un décalage dans la conversion des trophozoïtes en schizontes durant le premier cycle et une réduction importante de la parasitémie dans le second.(473) Cet effet a été défini comme étant la concentration de médicament nécessaire pour tuer un parasite au cours du second cycle de réplication. L'effet de mort retardée est donc directement lié au rapport entre CI_{50} (48h) et CI_{50} (96h) (au moins 10 fois). De plus, un domaine recombinant de la GyrB, sensible à la coumermycine (un inhibiteur de l'ATPase de la gyrase) a été caractérisé chez *P. vivax*.(475) Toutes ces études montrent le rôle prépondérant de l'apicoplaste dans la réplication de l'ADN.

II.1.5.4.2.4.5.2. Transcription de l'ADN en ARN

Le génome de l'apicoplaste code pour les sous-unités *rpoB*, *rpoC1* et *RpoC2* d'une ARN polymérase, semblable à celle trouvée chez les cyanobactéries et les chloroplastes.(476) L'inhibition indirecte de la transcription par le blocage de la traduction de ces sous-unités d'ARN polymérase semblait prometteuse.(404) En effet, il a été montré que le thiostrepton (un oligopeptide antibiotique cyclique naturel) a permis de réduire l'expression de *rpoB* et de *rpoC*.(477) Des résultats similaires ont été précédemment obtenus avec la doxycycline (un antibiotique tétracycline), qui possède également une activité d'inhibition de la synthèse de nucléotides et désoxynucléotides.(478) En effet, la doxycycline bloque spécifiquement l'expression du génome de l'apicoplaste et engendre la perte des fonctions de l'apicoplaste chez la descendance des parasites traités. Ceci conduit à un effet antipaludique lent mais puissant.(412) Les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de l'apicoplaste ne sont pas encore clairement compris. Néanmoins, une approche protéomique a été utilisée pour analyser les changements d'expression des protéines chez des schizontes de *P. falciparum* traités par de la doxycycline.(479) Selon les méthodes utilisées, le niveau d'expression de 30 à 40 protéines pourrait être affecté de manière significative. Cependant, un traitement au thiostrepton n'engendre pas l'effet de mort retardée, la disparition de l'apicoplaste et de la mitochondrie dans le premier cycle engendre l'arrêt du stade trophozoïte.(480) Cet effet immédiat peut être dû à une deuxième cible thérapeutique, telle que la mitochondrie.(481, 482) La rifampicine (antibiotique) réduit également l'expression de *rpoB* et la transcription de *rpoC* sans effet de mort retardée.(477, 480) Toutefois, il faut noter que la rifampicine ne cible pas la traduction des sous-unités de l'ARN polymérase, mais se lie de façon covalente à la sous-unité bêta

inhibant ainsi l'initiation de la transcription de l'ADN bactérien et la formation de l'ensemble des ARN messagers (ARNm), des ARN de transferts (ARNt) et des ARN ribosomiaux (ARNr).

Toutes ces études montrent que le ciblage de la traduction ou de la transcription engendrent des effets phénotypiques différents. Ceci peut s'expliquer par le fait que les molécules utilisées possèderaient une autre cible en plus de l'apicoplaste (ex : thiostrepton) ou que l'ARN transmis par l'apicoplaste est utilisé à l'extérieur de l'organite. Dans un ouvrage récent, il a été suggéré que le phénomène de mort retardée peut-être expliqué grâce aux processus de survie de la mitochondrie.(483) En effet, l'ARN de transfert formylméthionine (fMet) est utilisé comme amorceur d'acide aminé pour la traduction de l'ADN dans l'apicoplaste, mais aussi dans la mitochondrie. C'est pourquoi, l'arrêt de la distribution du fMet vers l'apicoplaste serait critique pour l'initiation de la traduction de l'ADN de l'apicoplaste et de la mitochondrie. En supposant que les sous-unités de l'ARN polymérase soient toutes présentes dans ce cycle de vie, l'inhibition de la traduction de l'ADN pourrait causer la mort retardée, alors que l'inhibition de la transcription de l'ADN aurait un effet immédiat. Cependant, il a été postulé, que lors du stade érythrocytaire, la seule fonction essentielle de l'apicoplaste serait la biosynthèse des isoprénoïdes(421), suggérant que la production de fMet ne serait pas essentielle pour l'initiation de la traduction mitochondriale.

II.1.5.4.2.4.5.3. Traduction de l'ARN

Dans *P. falciparum*, la plupart des antibiotiques, provoquant un phénomène de mort retardée, inhiberaient la traduction et interagiraient avec le ribosome de l'apicoplaste.(482) Leur mode d'action serait en relation avec une inhibition de l'allongement des peptides naissants. Ils interagiraient avec ces peptides (entre les sous-unités) à la sortie du tunnel du ribosome.(484) Récemment, la compréhension des mécanismes de traduction des protéines chez *Plasmodium*, et notamment sur les traductions nucléaire, apicoplastique, et mitochondriale, a été récemment résumée.(485)

De nombreux médicaments possèdent une action spécifique sur la traduction de l'ADN de l'apicoplaste, certains d'entre eux ayant déjà été utilisés. Par exemple, chez *T. gondii*, la clindamycine interagirait avec les grandes sous-unités de l'ARNr de l'apicoplaste(486), et très probablement avec la grande sous-unité 23S de l'ARNr chez *P. falciparum*. La clindamycine a été utilisée pour traiter le paludisme chez l'Homme, souvent en combinaison avec d'autres médicaments comme la fosmidomycine(487) ou la combinaison fosmidomycine / artésunate. L'azithromycine, agirait de la même manière que la clindamycine, mais par interaction avec la protéine ribosomique

L4 de l'apicoplaste de *P. falciparum* (PfRpl4). L'étude de deux lignées résistantes à l'azithromycine (7G8 et Dd2) ont révélé une mutation G76V sur la région de PfRpl4, validant ainsi ce mécanisme d'action.(488) Le thiostrepton, quant à lui, se lie à la sous-unité 23S de l'ARNr de l'apicoplaste de *P. falciparum*(489, 490), notamment au domaine de la GTPase(491).

Le phénotype de mort retardée de la plupart des médicaments ciblant l'apicoplaste a été récemment exploité pour développer une approche à «haut débit» basée sur la détection de luminescence (luciférase). Cette étude a permis d'identifier les cibles apicomplastiques de molécules antipaludiques (et aussi pour d'autres apicomplexes), et notamment les médicaments ciblant la traduction de l'ADN.(491) En comparant les phénotypes de mort retardée de l'azithromycine, qui cible spécifiquement la traduction de l'ADN de l'apicoplaste, il a été possible de révéler l'activité antipaludique sur d'autres molécules. Lors d'une de ces études, un antibiotique vétérinaire, le macrolide kitasamycine, a révélé un phénotype caractéristique de mort retardée et une action perturbatrice de l'apicoplaste similaire à celle de l'azithromycine. De plus cette molécule a révélé une activité antipaludique *in vitro* de l'ordre du nanomolaire (gamme basse). Un autre exemple, la clarithromycine, avait montré des résultats prometteurs similaires, mais a révélé une moins bonne activité antipaludique *in vitro* (gamme haute du nanomolaire). Une étude *in vivo* chez la souris infectée par *P. yoelii* a permis de valider ces résultats. En effet, un traitement de trois jours de kitamycine à la dose de 50 mg / kg a conduit à une réduction de $78 \pm 7\%$ de la parasitémie. Bien que ces résultats soient prometteurs, l'efficacité de l'azithromycine reste plus importante puisqu'à une dose dix fois inférieure, la même réduction de parasitémie a été observée.(491)

En conclusion, les processus de réplication, de transcription et la traduction de l'apicoplaste représentent des cibles concrètes pour le développement de médicaments anti-apicomplexes. Néanmoins, les différences de délai d'action des molécules (effet de mort retardée) devront être prises en considération lors de développements futurs. En effet, les médicaments, causant la mort immédiate du parasite, pourraient agir en dehors de l'apicoplaste, notamment au niveau de la mitochondrie. Il faut rester vigilant puisque l'hôte d'accueil possède une mitochondrie, ce qui pourrait engendrer des effets secondaires importants.

II.1.5.4.2.4.5.4. Molécules ciblant les processus moléculaires

Les processus moléculaires impliqués dans la réplication de l'ADN, sa transcription en ARNt, ARNr, et des ARNm et la traduction, offre une série complète de cibles qui peuvent être inhibées par différentes familles d'antibactériens. De nombreux médicaments comme les

macrolides, les kétolides, les lincosamides, les oxazolidinones, les aminosides, et les tétracyclines, utilisés dans le traitement des maladies infectieuses bactériennes peuvent interférer avec la synthèse des protéines en ciblant les ribosomes de l'agent pathogène,(492) et pourraient être utilisés comme agents antipaludiques. Il est désormais admis que les antibiotiques possédant une action antipaludique agissent au niveau de l'apicoplaste du parasite.(482, 493) Différents groupes ont étudié les ARNr comme cibles potentielles chez *Plasmodium*, ces différentes études ont permis de montrer que le thioestrepton se lie aux grandes sous-unités ribosomiques de l'ARNr de l'apicoplaste,(477, 489) la clindamycine agit sur les grandes sous-unité ribosomique de l'ARNr chez *T. gondii*,(486) et la tétracycline se lierait aux petites sous-unités de l'ARNr mitochondrial et / ou apicoplastique.(494) Néanmoins, il reste difficile d'évaluer si les antibiotiques agissent au niveau de l'apicoplaste, de la mitochondrie, ou au niveau des deux organelles en même temps. Dans le cas de la novobiocine, un inhibiteur de la gyrase B chez les procaryotes, un effet plus important a été relevé sur la réplication de l'ADN apicoplastique que sur l'ADN mitochondriale.(473) Pour la plupart des autres médicaments, agissant sur le métabolisme de l'ADN,(495) la spécificité pour l'apicoplaste ou la mitochondrie reste difficile à vérifier. Dans la partie suivante, nous nous intéresserons aux fluoroquinolones et plus particulièrement à la ciprofloxacine et à ses dérivés.

II.1.5.4.2.4.5.4.1. La ciprofloxacine

En 1962, une des premières quinolones(496, 497) fut synthétisée, l'acide nalidixique. Cette molécule est utilisée comme désinfectant, antiseptique et également comme antibiotique grâce à son pouvoir d'inhibition de l'ADN gyrase des bactéries. Dans les années 70, l'ajout d'un atome de fluor(498) a permis d'augmenter la pénétration membranaire des quinolones, ces nouvelles molécules ont été nommées fluoroquinolones. La ciprofloxacine(499) est une fluoroquinolone portant un groupement cyclopropyle sur l'azote N1 du noyau quinoléine (Figure 41).

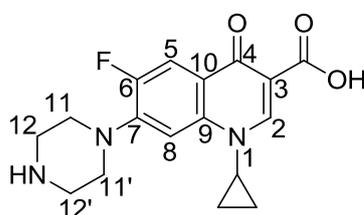


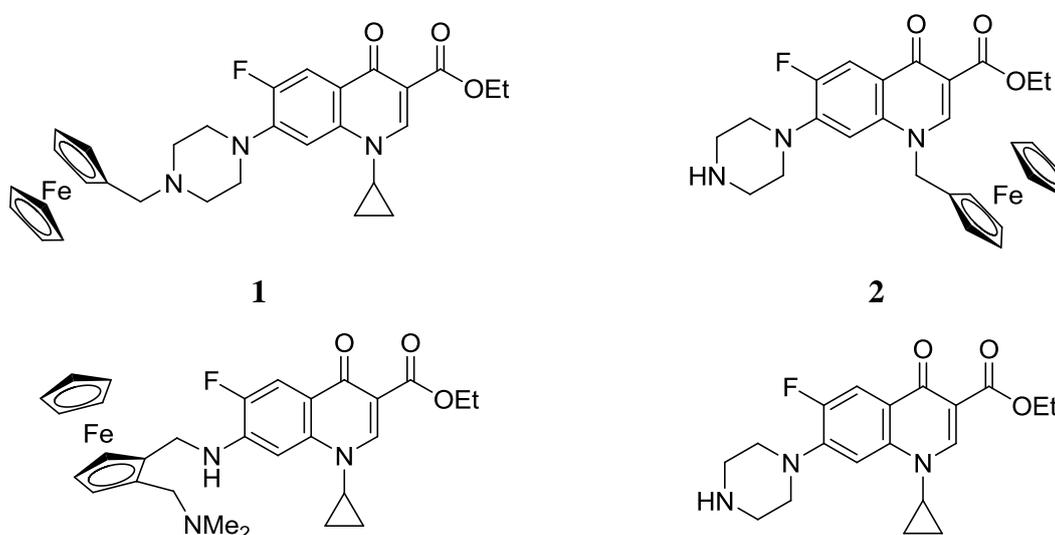
Figure 41 : Structure numérotée de la Ciprofloxacine

A la fin des années 1980, l'action antipaludique *in vitro* des quinolones et fluoroquinolones a été démontrée chez *P. falciparum*.(500) Les valeurs de CI_{50} étaient de l'ordre de 50 μ M. Chez les

bactéries, ces molécules sont connues pour affecter l'ADN bactérien en ciblant les topoisomères II et IV.(501, 502) Chez *P. falciparum*, le mode d'action de ces molécules a été étudié par comparaison avec ceux connus chez les bactéries. A l'époque, l'apicoplaste n'avait pas encore été découvert et l'on supposait alors que les quinolones et les fluoroquinolones agissaient au niveau de la mitochondrie. Des combinaisons de ciprofloxacine et de tétracycline (inhibiteur de la synthèse des protéines ribosomales) ou de novobiocine (inhibiteur de la sous-unité B de l'ADN gyrase) ont été testées afin de déterminer s'il existait un effet synergique entre ces molécules et ainsi permettre de vérifier si l'action des quinolones et fluoroquinolones impliquait bien la gyrase mitochondriale.(500) Les combinaisons testées ont révélé une action légèrement additive à 96h.(500) Les auteurs ont conclu que ces résultats ne permettaient pas de réfuter l'hypothèse de la gyrase, néanmoins, il a fallu attendre la découverte de l'apicoplaste chez *T. gondii* et *Plasmodium spp.* pour élucider le mode d'action de la ciprofloxacine.(12) Le mécanisme d'action proposé pour la ciprofloxacine est l'inhibition de la réplication de l'ADN. La ciprofloxacine ciblerait la gyrase de l'apicoplaste et conduirait ainsi à la formation d'apicoplastes anormaux et *in fine* à la mort retardée du parasite.(405, 413)

II.1.5.4.2.4.5.4.2. Analogues de la ciprofloxacine

Mes travaux de Master 2 concernaient la synthèse et la caractérisation d'analogues de la ciprofloxacine (Figure 42).(503) La conception de ces nouvelles fluoroquinolones reposait sur une double stratégie : une approche « prodrogue », par le remplacement du groupement acide carboxylique par un ester éthylique, et une approche bioorganométallique, par l'introduction d'un groupement ferrocénique à différents endroits de la ciprofloxacine.



3

4

Figure 42 : Structures chimiques des molécules cibles

Le remplacement de l'acide carboxylique par un ester éthylique a été effectué dans tous les nouveaux composés. L'introduction du ferrocène concerne les molécules 1, 2 et 3. L'analogue 1 résulte de l'alkylation du groupement pipérazine par un groupement ferrocenylméthyle. La molécule 2 provient du remplacement du cyclopropyle par un ferrocenylméthyle. Dans le composé 3, la modification consiste au remplacement de la pipérazine par une diamine ferrocénique.

Les activités antipaludiques de ces nouvelles molécules (*Tableau 5*) ont été déterminées par le groupe du Dr Bruno Pradines sur une souche CQ-sensible (3D7) et sur une CQ-résistante (W2), en comparaison avec la chloroquine, la doxycycline, l'artésunate et la quinine.

Composé	CI ₅₀ (μM) après 48h		CI ₅₀ (μM) après 96h	
	3D7	W2	3D7	W2
1	2,70 ± 0,4	3,80 ± 0,7	2,60 ± 0,2	2,90 ± 0,4
2	1,74 ± 0,2	1,53 ± 0,2	1,00 ± 0,2	0,80 ± 0,2
3	2,80 ± 0,5	2,20 ± 0,9	3,20 ± 0,3	2,50 ± 0,3
4	3,10 ± 0,4	3,90 ± 0,6	1,60 ± 0,4	3,10 ± 0,4
ciprofloxacine	45,90 ± 3,8	119,30 ± 17,8	10,1 ± 3,4	14,1 ± 4,3
doxycycline	12,00 ± 1,4	10,70 ± 2,1	1,70 ± 0,5	1,20 ± 0,3
	CI ₅₀ (nM) après 48h		CI ₅₀ (nM) après 96h	
	3D7	W2	3D7	W2
CQ	19,00 ± 4,0	480,00 ± 50,0	21,00 ± 3,0	462,00 ± 57,0
artésunate	1,70 ± 0,4	2,40 ± 0,7	2,00 ± 0,5	2,10 ± 0,8
quinine	186,00 ± 20,0	520,00 ± 42,0	162,00 ± 22,0	456,00 ± 61,0

Tableau 5 : Activité antipaludique *in vitro* des fluoroquinolones 1-4, de la ciprofloxacine, de la doxycycline, de la CQ, de l'artésunate et de la quinine.

Les analogues de la ciprofloxacine ont révélé des activités de l'ordre du micromolaire, constantes quel que soit le degré de résistance des souches à la CQ. Ce résultat n'est pas surprenant puisque la ciprofloxacine ne possède pas le même mécanisme d'action que la CQ.

Comparativement à la ciprofloxacine, cette étude a permis de montrer que le remplacement de l'acide carboxylique par un ester éthylique engendre une augmentation de l'activité d'un facteur 15 sur 3D7 et d'un facteur 30 sur W2, dès le premier cycle. Le remplacement du cyclopropyle par un groupement ferrocénique permet un gain (2 fois) de l'activité antipaludique. D'autre part, les molécules ont montré des activités supérieures à la doxycycline. Il est à noter que les molécules 1 et 4 présentent des CI_{50} similaires, suggérant que la molécule 4 pourrait être métabolisée en molécule 1 par perte d'un ion métallocénylcarbénium stable.

Ces résultats montrent que la stratégie prodrogue est la contribution principale à l'amélioration de l'activité antipaludique de ces molécules. De plus, sous leur forme prodrogue, les nouveaux composés présentent une lipophilie supérieure à celle de la ciprofloxacine. L'augmentation de la lipophilie pourrait permettre une amélioration du passage membranaire, qui est un facteur essentiel dans le développement de molécules antipaludiques visant l'apicoplaste. En effet, le nombre important de membranes pourrait être un frein à l'accumulation des molécules jusqu'à leur site d'action. Comme vu précédemment, les antibiotiques engendrent une mort cellulaire retardée chez les apicomplexes. De façon surprenante, les nouveaux composés n'engendrent pas cet effet.

Parmi les composés testés, le composé 2 présente la meilleure activité antipaludique et la plus haute hydrophobicité. Cette molécule a donc été sélectionnée pour un criblage plus vaste sur d'autres clones de sensibilité différente à la CQ (*Tableau 6*).

Clones	$CI_{50} \pm \text{écart type}$					
	2 (μM)	ciprofloxacine (μM)	doxycycline (μM)	CQ (nM)	quinine (nM)	artésunate (nM)
IMT 10500	2.36 ± 1.1	74.8 ± 9.4	13.3 ± 3.8	51 ± 18	314 ± 101	3.8 ± 0.4
IMT L1	2.0 ± 0.4	41.3 ± 6.4	8.4 ± 1.7	250 ± 48	543 ± 71	1.7 ± 0.6
IMT Vol	0.92 ± 0.1	51.6 ± 6.8	9.1 ± 2.1	267 ± 26	428 ± 69	3.0 ± 0.7
PA	1.32 ± 0.1	45.5 ± 2.4	12.9 ± 4.0	284 ± 46	571 ± 158	2.0 ± 0.5
FCR3	0.72 ± 0.1	74.3 ± 2.5	9.7 ± 2.3	501 ± 155	650 ± 143	2.1 ± 1.1
FCM29	0.44 ± 0.2	45.6 ± 1.5	11.06 ± 2.5	508 ± 63	5.8 ± 125	1.9 ± 0.5
IMT K2	1.35 ± 0.3	80.8 ± 5.8	14.9 ± 3.6	523 ± 89	6.7 ± 59	1.8 ± 0.7

Tableau 6 : Activités antipaludiques du composé 2, de la ciprofloxacine, de la doxycycline, de la chloroquine, de la quinine et de l'artésunate.

Le composé 2 présente une activité relativement constante quel que soit le niveau de sensibilité à la CQ des clones étudiés. De manière tout à fait intéressante, il est plus actif que la CQ sur le clone FCM29 et au moins aussi actif que la quinine sur le clone FCR3. De plus, on peut noter que l'activité antipaludique du composé 2 augmente d'un facteur variant de 10 à 100 fois par rapport à celle de la molécule parente.

Les résistances croisées de la molécule 2 avec plusieurs médicaments antipaludiques ont été évaluées. Sur la base des 9 clones testés, aucune résistance croisée n'a été observée ni avec la ciprofloxacine ($r^2 = 0,014$), ni avec la doxycycline ($r^2 = 0,052$), ni avec la quinine ($r^2 = 0,015$), ni avec l'artésunate ($r^2 = 0,074$). Une légère résistance croisée est observée avec la CQ ($r^2 = 0,421$). Ceci reflèterait que les deux composés partagent des similitudes dans leur mode d'action et/ou dans leur assimilation par le parasite.

L'interaction de la molécule 2 avec différents médicaments antipaludiques, a été déterminée grâce à la méthode des isobologrammes (*Figure 43*).

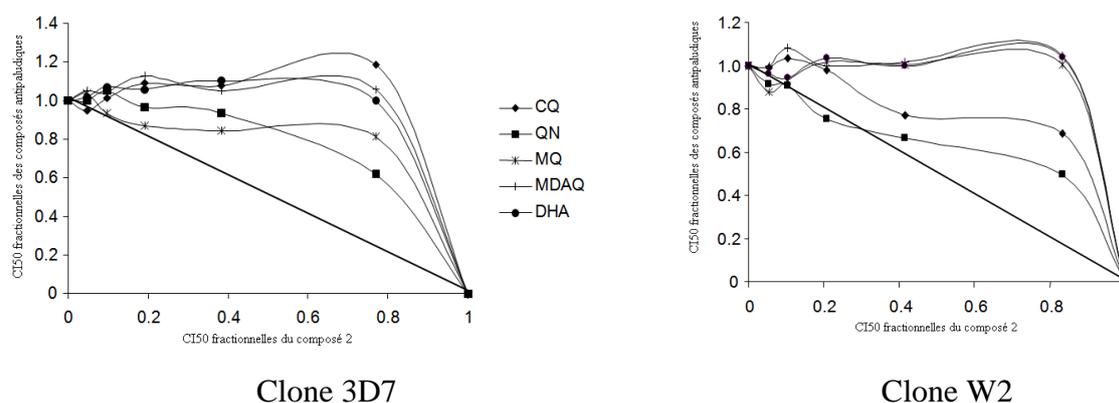


Figure 43 : Isobologrammes des interactions *in vitro* entre le composé 2 et la CQ, la quinine, la méfloquine, la quinine, méfloquine, monodeséthylamodiaquine et dihydroartémisinine sur les clones 3D7 et W2 de *P. falciparum*.

Chez le clone CQ-sensible 3D7, l'utilisation conjointe du composé 2 et des autres antipaludiques est antagoniste. Chez le clone chloroquino-résistant W2, l'analyse des

isobogrammes montre que le composé 2 exerce un effet antagoniste avec la MQ, la MDAQ et la DHA. Un faible effet additif est observé avec la CQ et la QN. Les différences de mode d'action des médicaments et de la molécule 2 auraient pu engendrer un fort effet additif, cependant, cela n'a pas été observé dans nos conditions expérimentales. Ces effets pourraient être liés à une relation entre les voies métaboliques possibles entre l'apicoplaste et la vacuole digestive.

La toxicité des molécules 1 à 4 a été évaluée sur des splénocytes de souris. La molécule 2 est plus toxique que la ciprofloxacine mais l'est moins que la CQ. Le composé 4 est moins toxique que le composé 2, pour une activité 2 fois moindre.

Pour conclure, cette approche montre que la stratégie prodrogue a entraîné une augmentation importante de l'activité antipaludique et que la stratégie bioorganométallique engendre une amélioration supplémentaire de l'activité. Le mécanisme d'action de ces molécules devra être étudié afin de pouvoir concevoir de nouvelles molécules plus efficaces et moins toxiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. WHO. (2010) Global report on antimalarial efficacy and drug resistance. 2000-2010.
2. Hassanein, S. M. A., Abd-El-Latif, M. M. S., Hassanin, O. M., Abd-El-Latif, L. M. S., et Ramadan, N. I. (2011) Cryptosporidium gastroenteritis in Egyptian children with acute lymphoblastic leukemia: magnitude of the problem, *Infection*.
3. Gabrielli, S., Galuppi, R., Marcer, F., Marini, C., Tampieri, M. P., Moretti, A., Pietrobelli, M., et Cancrini, G. (2012) Development of Culture-Based Serological Assays to Diagnose Babesia divergens Infections, *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 12, 106-110.
4. Cassini, R., Marcer, F., di Regalbono, A. F., Cancrini, G., Gabrielli, S., Moretti, A., Galuppi, R., Tampieri, M. P., et Pietrobelli, M. (2012) New insights into the epidemiology of bovine piroplasmoses in Italy, *Vet. Parasitol.* 184, 77-82.
5. Williams, R. B., Marshall, R. N., Pagès, M., Dardi, M., et del Cacho, E. (2009) Pathogenesis of Eimeria praecox in chickens: virulence of field strains compared with laboratory strains of E. praecox and Eimeria acervulina, *Avian Pathology* 38, 359-366.
6. Schwab, J. C., Beckers, C. J., et Joiner, K. A. (1994) The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular Toxoplasma gondii functions as a molecular sieve, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 509-513.
7. Ward, G. E., Miller, L. H., et Dvorak, J. A. (1993) The origin of parasitophorous vacuole membrane lipids in malaria-infected erythrocytes, *J. Cell. Sci.* 106 (Pt 1), 237-248.
8. Naomie S. Morissette, et L. David Sibley. (2002) Cytoskeleton of Apicomplexan Parasites, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66, 21-38.
9. Jérôme P. Vanderberg, Martin M. Weiss, et Stephen R. Mack. (1977) In vitro cultivation of the sporogonic stages of Plasmodium: a review., *Bulletin of the World Health Organisation*.
10. Paperna, I. (1995) Ultrastructural and developmental affinities of piscine coccidia, *Diseases of Aquatic Organisms* 22, 67-76.
11. Köhler, S., Delwiche, C. F., Denny, P. W., Tilney, L. G., Webster, P., Wilson, R. J., Palmer, J. D., et Roos, D. S. (1997) A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites, *Science* 275, 1485-1489.
12. McFadden, G. I., Reith, M. E., Munholland, J., et Lang-Unnasch, N. (1996) Plastid in human parasites, *Nature* 381, 482.
13. Botté, C. Y., Dubar, F., McFadden, G. I., Maréchal, E., et Biot, C. (2012) Plasmodium falciparum Apicoplast Drugs: Targets or Off-Targets?, *Chem. Rev.* 112, 1269-83.
14. J. Hiroshi Morisaki, John E. Heuser, et L. David Sibley. (1995) Invasion of Toxoplasma gondii occurs by active penetration of the host cell., *Journal of Cell Science* 108, 2457-2464.

15. Aliberti, J. (2005) Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma GONDII*, *Nature Reviews Immunology* 5, 162-170.
16. Kato, K., Sugi, T., et Iwanaga, T. (2011) Roles of Apicomplexan protein kinases at each life cycle stage, *Parasitology International*.
17. Howe, D. K., et Sibley, L. D. (1995) *Toxoplasma gondii* Comprises Three Clonal Lineages: Correlation of Parasite Genotype with Human Disease, *Journal of Infectious Diseases* 172, 1561-1566.
18. Sibley, L. D., Qiu, W., Fentress, S., Taylor, S. J., Khan, A., et Hui, R. (2009) Forward Genetics in *Toxoplasma gondii* Reveals a Family of Rhoptyry Kinases That Mediates Pathogenesis, *Eukaryotic Cell* 8, 1085-1093.
19. Ibebuike, K., Mantanga, L., Emereole, O., Ndolo, P., Kajee, A., Gopal, R., et Pather, S. (2012) Cerebellar toxoplasmosis in HIV/AIDS infant: case report and review of the literature, *Neurological Sciences*.
20. Kaye, A. (2011) Toxoplasmosis: Diagnosis, Treatment, and Prevention in Congenitally Exposed Infants, *Journal of Pediatric Health Care* 25, 355-364.
21. Spano, F., Putignani, L., McLaughlin, J., Casemore, D. P., et Crisanti, A. (2006) PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene discriminates between *C. wairi* and *C. parvum*, and between *C. parvum* isolates of human and animal origin, *FEMS Microbiology Letters* 150, 209-217.
22. Sulaiman, I. M., Xiao, L., Yang, C., Escalante, L., Moore, A., Beard, C. B., Arrowood, M. J., et Lal, A. A. (1998) Differentiating human from animal isolates of *Cryptosporidium parvum*, *Emerging Infect. Dis.* 4, 681-685.
23. Farthing, M. J. (2000) Clinical aspects of human cryptosporidiosis, *Contrib Microbiol* 6, 50-74.
24. Goodgame, R. W., Kimball, K., Ou, C. N., White, A. C., Jr, Genta, R. M., Lifschitz, C. H., et Chappell, C. L. (1995) Intestinal function and injury in acquired immunodeficiency syndrome-related cryptosporidiosis, *Gastroenterology* 108, 1075-1082.
25. Torsein, M., Lindberg, A., Sandgren, C. H., Waller, K. P., Törnquist, M., et Svensson, C. (2011) Risk factors for calf mortality in large Swedish dairy herds, *Prev. Vet. Med.* 99, 136-147.
26. DuPont, H. L., Chappell, C. L., Sterling, C. R., Okhuysen, P. C., Rose, J. B., et Jakubowski, W. (1995) The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers, *N. Engl. J. Med.* 332, 855-859.
27. Chen, X.-M., Levine, S. A., Tietz, P., Krueger, E., McNiven, M. A., Jefferson, D. M., Mahle, M., et LaRusso, N. F. (1998) *Cryptosporidium parvum* is cytopathic for cultured human biliary epithelia via an apoptotic mechanism, *Hepatology* 28, 906-913.

28. Chen, X. M., et LaRusso, N. F. (2000) Mechanisms of attachment and internalization of *Cryptosporidium parvum* to biliary and intestinal epithelial cells, *Gastroenterology* 118, 368-379.
29. Chen, X.-M., Keithly, J. S., Paya, C. V., et LaRusso, N. F. (2002) Cryptosporidiosis, *N Engl J Med* 346, 1723-1731.
30. WHO, World Malaria Report 2011.
31. Murray, C. J. L., Rosenfeld, L. C., Lim, S. S., Andrews, K. G., Foreman, K. J., Haring, D., Fullman, N., Naghavi, M., Lozano, R., et Lopez, A. D. (2012) Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis, *Lancet* 379, 413-431.
32. Cavalier-Smith, T. (2009) Kingdoms Protozoa and Chromista and the eozoan root of the eukaryotic tree, *Biology Letters* 6, 342-345.
33. Escalante, A. A., et Ayala, F. J. (1994) Phylogeny of the malarial genus *Plasmodium*, derived from rRNA gene sequences, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 11373-11377.
34. Jean Mouchet, Pierre Carnevale, Marc Coosemans, Jean Julvez, Sylvie Manguin, Dominique Richard-Lenoble, et Jacques Sircoulon. (2004) Biodiversité du paludisme dans le monde, John Libbey Eurotext, Paris.
35. Krzywinski, J. (2001) Evolution of Mitochondrial and Ribosomal Gene Sequences in Anophelinae (Diptera: Culicidae): Implications for Phylogeny Reconstruction, *Molecular Phylogenetics and Evolution* 18, 479-487.
36. Pages, F., Orlandipradines, E., et Corbel, V. (2007) Vecteurs du paludisme: biologie, diversité, contrôle et protection individuelle, *Médecine et Maladies Infectieuses* 37, 153-161.
37. Smallegange, R. C., Qiu, Y. T., van Loon, J. J. A., et Takken, W. (2005) Synergism between ammonia, lactic acid and carboxylic acids as kairomones in the host-seeking behaviour of the malaria mosquito *Anopheles gambiae sensu stricto* (Diptera: Culicidae), *Chem. Senses* 30, 145-152.
38. Lacroix, R., Mukabana, W. R., Gouagna, L. C., et Koella, J. C. (2005) Malaria Infection Increases Attractiveness of Humans to Mosquitoes, *PLoS Biology* 3, e298.
39. Faye, F. B. K., Spiegel, A., Tall, A., Sokhna, C., Fontenille, D., Rogier, C., et Trape, J. (2002) Diagnostic Criteria and Risk Factors for *Plasmodium ovale* Malaria, *The Journal of Infectious Diseases* 186, 690-695.
40. (2012) World Malaria Report 2011., World Health Organization.
41. Kantele, A., et Jokiranta, T. S. (2011) Review of Cases With the Emerging Fifth Human Malaria Parasite, *Plasmodium knowlesi*, *Clinical Infectious Diseases* 52, 1356-1362.
42. White, N. J. (2008) *Plasmodium knowlesi*: The Fifth Human Malaria Parasite, *Clinical Infectious Diseases* 46, 172-173.

43. Greenwood, B. M., Fidock, D. A., Kyle, D. E., Kappe, S. H. I., Alonso, P. L., Collins, F. H., et Duffy, P. E. (2008) Malaria: progress, perils, and prospects for eradication, *Journal of Clinical Investigation* 118, 1266-1276.
44. Sturm, A., Amino, R., van de Sand, C., Regen, T., Retzlaff, S., Rennenberg, A., Krueger, A., Pollok, J.-M., Menard, R., et Heussler, V. T. (2006) Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids, *Science* 313, 1287-1290.
45. Graewe, S., Rankin, K. E., Lehmann, C., Deschermeier, C., Hecht, L., Froehlke, U., Stanway, R. R., et Heussler, V. (2011) Hostile Takeover by Plasmodium: Reorganization of Parasite and Host Cell Membranes during Liver Stage Egress, *PLoS Pathogens* (Striepen, B., Éd.) 7, e1002224.
46. Kappe, S. H., Vaughan, A. M., Boddey, J. A., et Cowman, A. F. (2010) That was then but this is now: malaria research in the time of an eradication agenda, *Science* 328, 862-6.
47. Congrès de neurologie tropicale. (1994) Neurologie tropicale : compte rendu du Congrès de neurologie tropicale, Limoges, 26-28 septembre 1991, John Libbey Eurotext, Montrouge, France.
48. Porcherie, A., Mathieu, C., Peronet, R., Schneider, E., Claver, J., Commere, P.-H., Kiefer-Biasizzo, H., Karasuyama, H., Milon, G., Dy, M., Kinet, J.-P., Louis, J., Blank, U., et Mécheri, S. (2011) Critical role of the neutrophil-associated high-affinity receptor for IgE in the pathogenesis of experimental cerebral malaria, *J. Exp. Med.* 208, 2225-2236.
49. World Health Organization. (2000) Severe falciparum malaria, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 94, 1-90.
50. Milner, Jr., D. A., Dzamalala, C. P., Liomba, N. G., Molyneux, M. E., et Taylor, T. E. (2005) Sampling of Supraorbital Brain Tissue after Death: Improving on the Clinical Diagnosis of Cerebral Malaria, *The Journal of Infectious Diseases* 191, 805-808.
51. White, V. A., Lewallen, S., Beare, N. A. V., Molyneux, M. E., et Taylor, T. E. (2009) Retinal pathology of pediatric cerebral malaria in Malawi, *PLoS ONE* 4, e4317.
52. Beare, N. A. V., Taylor, T. E., Harding, S. P., Lewallen, S., et Molyneux, M. E. (2006) Malarial retinopathy: a newly established diagnostic sign in severe malaria, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75, 790-797.
53. Looareesuwan, S. (1985) QUININE AND SEVERE FALCIPARUM MALARIA IN LATE PREGNANCY, *The Lancet* 326, 4-8.
54. WHO. (2010) Guidelines for the treatment of malaria. Second edition.
55. Brabin, B. J. (1983) An analysis of malaria in pregnancy in Africa, *Bull. World Health Organ.* 61, 1005-1016.
56. Mens, P. F., Bojtor, E. C., et Schallig, H. D. F. H. (2010) Molecular interactions in the placenta during malaria infection, *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 152, 126-132.

57. Uneke, C. J. (2007) Impact of placental *Plasmodium falciparum* malaria on pregnancy and perinatal outcome in sub-Saharan Africa: I: introduction to placental malaria, *Yale J Biol Med* 80, 39-50.
58. Brabin, B. J., Romagosa, C., Abdelgalil, S., Menéndez, C., Verhoeff, F. H., McGready, R., Fletcher, K. A., Owens, S., D'Alessandro, U., Nosten, F., Fischer, P. R., et Ordi, J. (2004) The sick placenta-the role of malaria, *Placenta* 25, 359-378.
59. Ndiath, M. O., Sougoufara, S., Gaye, A., Mazonot, C., Konate, L., Faye, O., Sokhna, C., et Trape, J.-F. (2012) Resistance to DDT and Pyrethroids and Increased *kdr* Mutation Frequency in *An. gambiae* after the Implementation of Permethrin-Treated Nets in Senegal, *PLoS ONE* (Paul, R. E., Éd.) 7, e31943.
60. Thomas, M. B., et Read, A. F. (2007) Can fungal biopesticides control malaria?, *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 377-383.
61. Howard, A. F. V., Koenraadt, C. J. M., Farenhorst, M., Knols, B. G. J., et Takken, W. (2010) Pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* leads to increased susceptibility to the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*, *Malar. J.* 9, 168.
62. Farenhorst, M., Knols, B. G. J., Thomas, M. B., Howard, A. F. V., Takken, W., Rowland, M., et N'Guessan, R. (2010) Synergy in efficacy of fungal entomopathogens and permethrin against West African insecticide-resistant *Anopheles gambiae* mosquitoes, *PLoS ONE* 5, e12081.
63. Fang, W., Vega-Rodriguez, J., Ghosh, A. K., Jacobs-Lorena, M., Kang, A., et St. Leger, R. J. (2011) Development of Transgenic Fungi That Kill Human Malaria Parasites in Mosquitoes, *Science* 331, 1074-1077.
64. Ghosh, A. K., Ribolla, P. E., et Jacobs-Lorena, M. (2001) Targeting *Plasmodium* ligands on mosquito salivary glands and midgut with a phage display peptide library, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 13278-13281.
65. Carballar-Lejarazú, R., Rodríguez, M. H., de la Cruz Hernández-Hernández, F., Ramos-Castañeda, J., Possani, L. D., Zurita-Ortega, M., Reynaud-Garza, E., Hernández-Rivas, R., Loukeris, T., Lycett, G., et Lanz-Mendoza, H. (2008) Recombinant scorpine: a multifunctional antimicrobial peptide with activity against different pathogens, *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 3081-3092.
66. Crampton, J., Morris, A., Lycett, G., Warren, A., et Eggleston, P. (1990) Transgenic mosquitoes: a future vector control strategy?, *Parasitol. Today (Regul. Ed.)* 6, 31-36.
67. Perera, O. P., Harrell II, R. A., et Handler, A. M. (2002) Germ-line transformation of the South American malaria vector, *Anopheles albimanus*, with a piggyBac/EGFP transposon vector is routine and highly efficient, *Insect Mol. Biol.* 11, 291-297.
68. Lobo, N. F., Hua-Van, A., Li, X., Nolen, B. M., et Fraser, M. J., Jr. (2002) Germ line transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, mediated by transpositional insertion of a piggyBac vector, *Insect Mol. Biol.* 11, 133-139.

69. Ito, J., Ghosh, A., Moreira, L. A., Wimmer, E. A., et Jacobs-Lorena, M. (2002) Transgenic anopheline mosquitoes impaired in transmission of a malaria parasite, *Nature* 417, 452-455.
70. Moreira, L. A., Edwards, M. J., Adhami, F., Jasinskiene, N., James, A. A., et Jacobs-Lorena, M. (2000) Robust gut-specific gene expression in transgenic *Aedes aegypti* mosquitoes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 10895-10898.
71. Dong, Y., Das, S., Cirimotich, C., Souza-Neto, J. A., McLean, K. J., et Dimopoulos, G. (2011) Engineered Anopheles Immunity to Plasmodium Infection, *PLoS Pathogens* (Vernick, K. D., Éd.) 7, e1002458.
72. Weaver, J. (2010) Mosquitoes inherit DEET resistance, *Nature*.
73. World Health Organization., Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases., Foundation for Innovative New Diagnostics., et Centers for Disease Control (U.S.). (2009) Malaria rapid diagnostic test performance : results of WHO product testing of malaria RDTs : round 1 (2008)., World Health Organization on behalf of the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, Geneva.
74. Rosenthal, P. J. (2001) Antimalarial chemotherapy : mechanisms of action, resistance and new directions in drug discovery., Humana Press, [S.l.].
75. (2009) Ancient Chinese anti-fever cure becomes panacea for malaria, *Bulletin of the World Health Organization* 87, 743-744.
76. Haynes, R. K., et Vonwiller, S. C. (1997) From Qinghao, Marvelous Herb of Antiquity, to the Antimalarial Trioxane Qinghaosu and Some Remarkable New Chemistry, *Accounts of Chemical Research* 30, 73-79.
77. Klayman, D. (1985) Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China, *Science* 228, 1049-1055.
78. White, N. J. (2008) Qinghaosu (Artemisinin): The Price of Success, *Science* 320, 330-334.
79. Global Partnership to Roll Back Malaria., World Health Organization., et UNICEF. (2005) World malaria report 2005, World Health Organization : UNICEF, Geneva.
80. Noedl, H., Se, Y., Schaefer, K., Smith, B. L., Socheat, D., et Fukuda, M. M. (2008) Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia, *N Engl J Med* 359, 2619-20.
81. Achan, J., Talisuna, A. O., Erhart, A., Yeka, A., Tibenderana, J. K., Baliraine, F. N., Rosenthal, P. J., et D'Alessandro, U. (2011) Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria, *Malaria Journal* 10, 144.
82. Butler, A. R., Khan, S., et Ferguson, E. (2010) A brief history of malaria chemotherapy, *J R Coll Physicians Edinb* 40, 172-177.
83. Schlitzer, M. (2008) Antimalarial drugs - what is in use and what is in the pipeline, *Arch. Pharm. (Weinheim)* 341, 149-163.

84. Jelinek, T., Schelbert, P., Loscher, T., et Eichenlaub, D. (1995) Quinine resistant falciparum malaria acquired in east Africa, *Trop Med Parasitol* 46, 38-40.
85. Greenwood, D. (1995) Conflicts of interest: the genesis of synthetic antimalarial agents in peace and war, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 36, 857-872.
86. Peters, W. (1987) Chemotherapy and drug resistance in malaria, Academic Press Inc; 2nd Revised edition edition (Sep 1987), London.
87. Adjuik, M., Agnamey, P., Babiker, A., Borrmann, S., Brasseur, P., Cisse, M., Cobelens, F., Diallo, S., Faucher, J. F., Garner, P., Gikunda, S., Kremsner, P. G., Krishna, S., Lell, B., Loolpapit, M., Matsiegui, P. B., Missinou, M. A., Mwanza, J., Ntoumi, F., Olliaro, P., Osimbo, P., Rezbach, P., Some, E., et Taylor, W. R. J. (2002) Amodiaquine-artesunate versus amodiaquine for uncomplicated Plasmodium falciparum malaria in African children: a randomised, multicentre trial, *Lancet* 359, 1365-1372.
88. Sá, J. M., Twu, O., Hayton, K., Reyes, S., Fay, M. P., Ringwald, P., et Wellems, T. E. (2009) Geographic patterns of Plasmodium falciparum drug resistance distinguished by differential responses to amodiaquine and chloroquine, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 18883-18889.
89. Tin, F., Hlaing, N., et Lasserre, R. (1982) Single-dose treatment of falciparum malaria with mefloquine: field studies with different doses in semi-immune adults and children in Burma, *Bull. World Health Organ.* 60, 913-917.
90. Milatovic, D., Jenkins, J. W., Hood, J. E., Yu, Y., Rongzhu, L., et Aschner, M. (2011) Mefloquine neurotoxicity is mediated by non-receptor tyrosine kinase, *Neurotoxicology* 32, 578-585.
91. Boudreau, E. F., K., W. H., K., P., et Thosinghat, L. (1982) Type II mefloquine resistance in thailand, *The Lancet* 320, 1335.
92. Fernando, D., Rodrigo, C., et Rajapakse, S. (2011) Primaquine in vivax malaria: an update and review on management issues, *Malaria Journal* 10, 351.
93. Vale, N., Moreira, R., et Gomes, P. (2009) Primaquine revisited six decades after its discovery, *Eur J Med Chem* 44, 937-953.
94. Burgoine, K. L., Bancone, G., et Nosten, F. (2010) The reality of using primaquine, *Malar. J.* 9, 376.
95. Ganesan, S., Chaurasiya, N. D., Sahu, R., Walker, L. A., et Tekwani, B. L. (2012) Understanding the mechanisms for metabolism-linked hemolytic toxicity of primaquine against glucose 6-phosphate dehydrogenase deficient human erythrocytes: Evaluation of eryptotic pathway, *Toxicology* 294, 54-60.
96. Kitchen, L. W., Vaughn, D. W., et Skillman, D. R. (2006) Role of US military research programs in the development of US Food and Drug Administration--approved antimalarial drugs, *Clin. Infect. Dis.* 43, 67-71.

97. ter Kuile, F. O., Dolan, G., Nosten, F., Edstein, M. D., Luxemburger, C., Phaipun, L., Chongsuphajaisiddhi, T., Webster, H. K., et White, N. J. (1993) Halofantrine versus mefloquine in treatment of multidrug-resistant falciparum malaria, *Lancet* 341, 1044-1049.
98. Olliaro, P. L., et Trigg, P. I. (1995) Status of antimalarial drugs under development, *Bull. World Health Organ.* 73, 565-571.
99. Kokwaro, G., Mwai, L., et Nzila, A. (2007) Artemether/lumefantrine in the treatment of uncomplicated falciparum malaria, *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 8, 75-94.
100. Mita, T., Tanabe, K., et Kita, K. (2009) Spread and evolution of Plasmodium falciparum drug resistance, *Parasitol. Int.* 58, 201-209.
101. Björkman, A., et Phillips-Howard, P. A. (1990) The epidemiology of drug-resistant malaria, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 84, 177-180.
102. Daneshvar, C., Davis, T. M. E., Cox-Singh, J., Rafa'ee, M. Z., Zakaria, S. K., Divis, P. C. S., et Singh, B. (2009) Clinical and Laboratory Features of Human Plasmodium knowlesi Infection, *Clinical Infectious Diseases* 49, 852-860.
103. Barber, B. E., William, T., Jikal, M., Jilip, J., Dhararaj, P., Menon, J., Yeo, T. W., et Anstey, N. M. (2011) Plasmodium knowlesi malaria in children, *Emerging Infect. Dis.* 17, 814-820.
104. William, T., Menon, J., Rajahram, G., Chan, L., Ma, G., Donaldson, S., Khoo, S., Frederick, C., Jelip, J., Anstey, N. M., et Yeo, T. W. (2011) Severe Plasmodium knowlesi malaria in a tertiary care hospital, Sabah, Malaysia, *Emerging Infect. Dis.* 17, 1248-1255.
105. O'Neill, P. M., Amewu, R. K., Nixon, G. L., Bousejra ElGarah, F., Mungthin, M., Chadwick, J., Shone, A. E., Vivas, L., Lander, H., Barton, V., Muangnoicharoen, S., Bray, P. G., Davies, J., Park, B. K., Wittlin, S., Brun, R., Preschel, M., Zhang, K., et Ward, S. A. (2010) Identification of a 1,2,4,5-tetraoxane antimalarial drug-development candidate (RKA 182) with superior properties to the semisynthetic artemisinins, *Angew Chem Int Ed Engl* 49, 5693-7.
106. Cosledan, F., Fraisse, L., Pellet, A., Guillou, F., Mordmuller, B., Kremsner, P. G., Moreno, A., Mazier, D., Maffrand, J. P., et Meunier, B. (2008) Selection of a trioxaquine as an antimalarial drug candidate, *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 17579-84.
107. Cassera, M. B., Hazleton, K. Z., Merino, E. F., Obaldia, N., Ho, M.-C., Murkin, A. S., DePinto, R., Gutierrez, J. A., Almo, S. C., Evans, G. B., Babu, Y. S., et Schramm, V. L. (2011) Plasmodium falciparum Parasites Are Killed by a Transition State Analogue of Purine Nucleoside Phosphorylase in a Primate Animal Model, *PLoS ONE* (Bogyo, M., Éd.) 6, e26916.
108. Coteron, J. M., Marco, M., Esquivias, J., Deng, X., White, K. L., White, J., Koltun, M., El Mazouni, F., Kokkonda, S., Katneni, K., Bhamidipati, R., Shackelford, D. M., Angulo-Barturen, I., Ferrer, S. B., Jiménez-Díaz, M. B., Gamo, F.-J., Goldsmith, E. J., Charman, W. N., Bathurst, I., Floyd, D., Matthews, D., Burrows, J. N., Rathod, P. K., Charman, S. A., et Phillips, M. A. (2011) Structure-guided lead optimization of triazolopyrimidine-ring substituents identifies potent Plasmodium falciparum dihydroorotate dehydrogenase inhibitors with clinical candidate potential, *J. Med. Chem.* 54, 5540-5561.

109. DSM265 | MMV. www.mmv.org
110. Powles, M. A., Allocco, J., Yeung, L., Nare, B., Liberator, P., et Schmatz, D. (2012) MK-4815: A Potential New Oral Agent for the Treatment of Malaria, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.
111. MK 4815 | MMV. www.mmv.org
112. Tarnchompoo Bongkoch, Yuthavong Yongyuth, Vilaivan Tirayut, Chritnumsub Penchit, Thongpanchang Chawanee, Kamchonwongpaisan Sumalee, Matthews David, Vivas Lisa, Yuvaniyama Jirundon, Charman Susan, Charman William, et Katiyar Sanjay Babu. Antimalarial compounds with flexible side-chains. PCT/US2008/079210
113. Elizabeth Poll, et Jaya Banerji. (2011) MMV Annual Report 2011.
114. Barker, R. H., Uргаonkar, S., Mazitschek, R., Celatka, C., Skerlj, R., Cortese, J. F., Tyndall, E., Liu, H., Cromwell, M., Sidhu, A. B., Guerrero-Bravo, J. E., Crespo-Llado, K. N., Serrano, A. E., Lin, J. -w., Janse, C. J., Khan, S. M., Duraisingh, M., Coleman, B. I., Angulo-Barturen, I., Jimenez-Diaz, M. B., Magan, N., Gomez, V., Ferrer, S., Martinez, M. S., Wittlin, S., Papastogiannidis, P., O'Shea, T., Klinger, J. D., Bree, M., Lee, E., Levine, M., Wiegand, R. C., Munoz, B., Wirth, D. F., Clardy, J., Bathurst, I., et Sybertz, E. (2011) Aminoundoles, a Novel Scaffold with Potent Activity against Plasmodium falciparum, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55, 2612-2622.
115. Delves, M., Plouffe, D., Scheurer, C., Meister, S., Wittlin, S., Winzeler, E. A., Sinden, R. E., et Leroy, D. (2012) The activities of current antimalarial drugs on the life cycle stages of Plasmodium: a comparative study with human and rodent parasites, *PLoS Med.* 9, e1001169.
116. Staines, H. M., et Krishna, S. (2012) Treatment and prevention of malaria antimalarial drug chemistry, action and use, Springer, Basel. ISB 978-3-0346-0479-6
117. GNF156 | MMV. www.mmv.org
118. Guiguemde, W. A., Shelat, A. A., Garcia-Bustos, J. F., Diagana, T. T., Gamo, F.-J., et Guy, R. K. (2012) Global Phenotypic Screening for Antimalarials, *Chemistry & Biology* 19, 116-129.
119. Sevuparin/DF02 as an Adjuvant Therapy in Subjects Affected With Uncomplicated Falciparum Malaria. clinicaltrials.gov
120. Mzayek, F., Deng, H., Mather, F. J., Wasilevich, E. C., Liu, H., Hadi, C. M., Chansolme, D. H., Murphy, H. A., Melek, B. H., Tenaglia, A. N., Mushatt, D. M., Dreisbach, A. W., Lertora, J. J. L., et Krogstad, D. J. (2007) Randomized Dose-Ranging Controlled Trial of AQ-13, a Candidate Antimalarial, and Chloroquine in Healthy Volunteers, *PLoS Clinical Trials* 2, e6.
121. Single-Blind, Placebo-Controlled, Randomized Study Testing Single Ascending Doses Of GSK369796 In Healthy Subjects - ClinicalTrials.gov.

122. O'Neill, P. M., Barton, V. E., Ward, S. A., et Chadwick, J. (2012) 4-Aminoquinolines: Chloroquine, Amodiaquine and Next-Generation Analogues. In *Treatment and Prevention of Malaria* (Staines, H. M., et Krishna, S., Éd.), p 19-44, Springer Basel, Basel.
123. Olliaro, P., et Wells, T. N. (2009) The global portfolio of new antimalarial medicines under development, *Clin Pharmacol Ther* 85, 584-95.
124. Novartis Group. Novartis groups annual report 2011, p 2011.
125. Phase IIa NITD609. clinicaltrials.gov
126. Charman, S. A., Arbe-Barnes, S., Bathurst, I. C., Brun, R., Campbell, M., Charman, W. N., Chiu, F. C. K., Chollet, J., Craft, J. C., Creek, D. J., Dong, Y., Matile, H., Maurer, M., Morizzi, J., Nguyen, T., Papastogiannidis, P., Scheurer, C., Shackelford, D. M., Sriraghavan, K., Stingelin, L., Tang, Y., Urwyler, H., Wang, X., White, K. L., Wittlin, S., Zhou, L., et Vennerstrom, J. L. (2011) Synthetic ozonide drug candidate OZ439 offers new hope for a single-dose cure of uncomplicated malaria, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 4400-4405.
127. OZ439, Phase IIa. clinicaltrials.gov
128. A Exploratory, Open Label, Single Dose Regimen, Multiple Dose Testing Clinical Study to Assess the Preliminary Efficacy, Tolerability and Pharmacokinetics of OZ439 in Adult Patients With Acute, Uncomplicated Plasmodium Falciparum or Vivax Malaria Mono-infection - ClinicalTrials.gov.
129. Evaluation of Fosmidomycin and Clindamycin in the Treatment of Acute Uncomplicated Plasmodium Falciparum Malaria - Gabon. clinicaltrials.gov
130. Evaluation of Fosmidomycin and Clindamycin in the Treatment of Acute Uncomplicated P.Falciparum Malaria in Children - Mozambique. clinicaltrials.gov
131. Fosmidomycin With Clindamycin or With Clindamycin Plus Artesunate.
132. Fosmidomycin and Azithromycin for Acute Uncomplicated Plasmodium Falciparum Malaria (P. Malaria) in Adults. clinicaltrials.gov
133. Efficacy of Fosmidomycin-Clindamycin for Treating Malaria in Gabonese Children.
134. Treatment of Malaria in Gabon With Fosmidomycin-Clindamycin. clinicaltrials.gov
135. Safety and Efficacy of Methylene Blue Combined With Artesunate or Amodiaquine for Malaria Treatment in Children of Burkina Faso: a Pilot Study. clinicaltrials.gov
136. Safety and Efficacy of Methylene Blue Combined With Amodiaquine or Artesunate for Malaria Treatment in Children of Burkina Faso. clinicaltrials.gov
137. Efficacy and Safety of Artesunate-amodiaquine-methylene for Malaria Treatment in Children. clinicaltrials.gov

138. Efficacy of Methylene Blue for Malaria Treatment in Adults of Burkina Faso: Proof of Principle Study in Semi-Immune Adults of Burkina Faso in the Frame of the A8 Project of the SFB 544. clinicaltrials.gov
139. Study of SAR97276A in the Treatment of Uncomplicated and Severe Malaria in Adults and Children. clinicaltrials.gov
140. Anti-parasitic Activity and Safety Assessment of SAR97276A in Children With Uncomplicated Malaria. clinicaltrials.gov
141. Dose Ranging Study of Ferroquine With Artesunate in African Adults and Children With Uncomplicated Plasmodium Falciparum Malaria - ClinicalTrials.gov.
142. European Medicines Agency, et Committee for medicinal products for human use. (2012) Pyramax - Pyronaridine tetraphosphate / artesunate, United Kingdom. clinicaltrials.gov
143. Pyronaridine Artesunate 3:1 Granule Formulation vs. Coartem© Crushed Tablets in P. Falciparum Malaria Pediatric Patients. clinicaltrials.gov
144. Pyronaridine Artesunate (3:1) Versus Mefloquine Artesunate in P Falciparum Malaria Patients. clinicaltrials.gov
145. Pyronaridine Artesunate (3:1) Versus Coartem® in P Falciparum Malaria Patients - ClinicalTrials.gov.
146. Azithromycin Plus Chloroquine Versus Atovaquone-Proguanil For The Treatment Of Uncomplicated Plasmodium Falciparum Malaria In South America. clinicaltrials.gov
147. Azithromycin Plus Chloroquine Versus Mefloquine for the Treatment of Uncomplicated Malaria in Africa. clinicaltrials.gov
148. Trial of Azithromycin Plus Chloroquine Versus Sulfadoxine-Pyrimethamine Plus Chloroquine for the Treatment of Uncomplicated Malaria in India. clinicaltrials.gov
149. Evaluate Azithromycin Plus Chloroquine And Sulfadoxine Plus Pyrimethamine Combinations For Intermittent Preventive Treatment Of Falciparum Malaria Infection In Pregnant Women In Africa. clinicaltrials.gov
150. Azithromycin Plus Chloroquine Versus Artemether-Lumefantrine For The Treatment Of Uncomplicated P. Falciparum Malaria In Children In Africa. clinicaltrials.gov
151. Azithromycin Plus Chloroquine Versus Mefloquine In the Treatment of Uncomplicated P. Falciparum Malaria. clinicaltrials.gov
152. Ph 2B/3 Tafenoquine (TFQ) Study in Prevention of Vivax Relapse. clinicaltrials.gov
153. Study to Evaluate the Efficacy and Safety of Tafenoquine for the Treatment of Plasmodium Vivax in Adults. clinicaltrials.gov
154. Tafenoquine/Chloroquine DDI Study. clinicaltrials.gov

155. G6PD (Glucose-6-phosphate Dehydrogenase) Study to Evaluate Hemolysis Potential of TFQ (Tafenoquine). clinicaltrials.gov
156. Projet « Pratiques traditionnelles et soins de santé primaire » Rapport final de la Phase II. clinicaltrials.gov
157. Willcox, M. L., Graz, B., Falquet, J., Diakite, C., Giani, S., et Diallo, D. (2011) A « reverse pharmacology » approach for developing an anti-malarial phytomedicine, *Malar. J.* 10 Suppl 1, S8.
158. Efficacy of ArTiMist™ in Children. clinicaltrials.gov
159. Chemopreventive Therapy for Malaria in Ugandan Children. clinicaltrials.gov
160. Impact of Cotrimoxazole Prophylaxis for HIV-Infected Adults on Antifolate Resistance.
161. Sandison, T. G., Homsy, J., Arinaitwe, E., Wanzira, H., Kakuru, A., Bigira, V., Kalamya, J., Vora, N., Kublin, J., Kamya, M. R., Dorsey, G., et Tappero, J. W. (2011) Protective efficacy of co-trimoxazole prophylaxis against malaria in HIV exposed children in rural Uganda: a randomised clinical trial, *BMJ* 342, d1617.
162. Randomized Trial of Erythropoietin During Cerebral Malaria - ClinicalTrials.gov.
163. Picot, S., Bienvenu, A.-L., Konate, S., Sissoko, S., Barry, A., Diarra, E., Bamba, K., Djimdé, A., et Doumbo, O. K. (2009) Safety of epoietin beta-quinine drug combination in children with cerebral malaria in Mali, *Malaria Journal* 8, 169.
164. Boissel, J. P., et Bunn, H. F. (1990) Erythropoietin structure-function relationships, *Prog. Clin. Biol. Res.* 352, 227-232.
165. ASMQ – Fixed-Dose Artesunate/Mefloquine (Malaria). clinicaltrials.gov
166. WHO Market Authorisation Application.
167. Artesunate for injection | MMV. clinicaltrials.gov
168. Eurartesim® (dihydroartemisinin-piperaquine DHA/PQP) | MMV. clinicaltrials.gov
169. ASAQ : Artesunate-Amodiaquine | MMV. clinicaltrials.gov
170. Coartem® Dispersible (artemether-lumefantrine) | MMV. clinicaltrials.gov
171. Gamo, F. J., Sanz, L. M., Vidal, J., de Cozar, C., Alvarez, E., Lavandera, J. L., Vanderwall, D. E., Green, D. V., Kumar, V., Hasan, S., Brown, J. R., Peishoff, C. E., Cardon, L. R., et Garcia-Bustos, J. F. (2010) Thousands of chemical starting points for antimalarial lead identification, *Nature* 465, 305-10.
172. Agnandji, S. T., Lell, B., Soulanoudjingar, S. S., Fernandes, J. F., Abossolo, B. P., Conzelmann, C., Methogo, B. G. N. O., Doucka, Y., Flamen, A., Mordmüller, B., Issifou, S., Kremsner, P. G., Sacarlal, J., Aide, P., Lanaspá, M., Aponte, J. J., Nhamuave, A., Quelhas,

- D., Bassat, Q., Mandjate, S., Macete, E., Alonso, P., Abdulla, S., Salim, N., Juma, O., Shomari, M., Shubis, K., Machera, F., Hamad, A. S., Minja, R., Mtoro, A., Sykes, A., Ahmed, S., Urassa, A. M., Ali, A. M., Mwangoka, G., Tanner, M., Tinto, H., D'Alessandro, U., Sorgho, H., Valea, I., Tahita, M. C., Kaboré, W., Ouédraogo, S., Sandrine, Y., Guiguemdé, R. T., Ouédraogo, J. B., Hamel, M. J., Kariuki, S., Odero, C., Oneko, M., Otieno, K., Awino, N., Omoto, J., Williamson, J., Muturi-Kioi, V., Laserson, K. F., Slutsker, L., Otieno, W., Otieno, L., Nekoye, O., Gondi, S., Otieno, A., Ogutu, B., Wasuna, R., Owira, V., Jones, D., Onyango, A. A., Njuguna, P., Chilengi, R., Akoo, P., Kerubo, C., Gitaka, J., Maingi, C., Lang, T., Olotu, A., Tsofa, B., Bejon, P., Peshu, N., Marsh, K., Owusu-Agyei, S., Asante, K. P., Osei-Kwakye, K., Boahen, O., Ayamba, S., Kayan, K., Owusu-Ofori, R., Dosoo, D., Asante, I., Adjei, G., Adjei, G., Chandramohan, D., Greenwood, B., Lusingu, J., Gesase, S., Malabeja, A., Abdul, O., Kilavo, H., Mahende, C., Liheluka, E., Lemnge, M., Theander, T., Drakeley, C., Ansong, D., Agbenyega, T., Adjei, S., Boateng, H. O., Rettig, T., Bawa, J., Sylverken, J., Sambian, D., Agyekum, A., Owusu, L., Martinson, F., Hoffman, I., Mvalo, T., Kamthunzi, P., Nkomo, R., Msika, A., Jumbe, A., Chome, N., Nyakuipa, D., Chintedza, J., Ballou, W. R., Bruls, M., Cohen, J., Guerra, Y., Jongert, E., Lapierre, D., Leach, A., Lievens, M., Ofori-Anyinam, O., Vekemans, J., Carter, T., Lebouilleux, D., Loucq, C., Radford, A., Savarese, B., Schellenberg, D., Sillman, M., et Vansadia, P. (2011) First results of phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African children, *N. Engl. J. Med.* 365, 1863-1875.
173. Olliaro, P. L., et Goldberg, D. E. (1995) The plasmodium digestive vacuole: metabolic headquarters and choice drug target, *Parasitol. Today (Regul. Ed.)* 11, 294-297.
174. Aikawa, M., Hepler, P. K., Huff, C. G., et Sprinz, H. (1966) The feeding mechanism of avian malarial parasites, *J. Cell Biol.* 28, 355-373.
175. Liu, J., Istvan, E. S., Gluzman, I. Y., Gross, J., et Goldberg, D. E. (2006) Plasmodium falciparum ensures its amino acid supply with multiple acquisition pathways and redundant proteolytic enzyme systems, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 8840-8845.
176. Krugliak, M., Zhang, J., et Ginsburg, H. (2002) Intraerythrocytic Plasmodium falciparum utilizes only a fraction of the amino acids derived from the digestion of host cell cytosol for the biosynthesis of its proteins, *Mol Biochem Parasitol* 119, 249-56.
177. Loria, P., Miller, S., Foley, M., et Tilley, L. (1999) Inhibition of the peroxidative degradation of haem as the basis of action of chloroquine and other quinoline antimalarials, *Biochem. J* 339 (Pt 2), 363-370.
178. Lazarus, M. D., Schneider, T. G., et Taraschi, T. F. (2008) A new model for hemoglobin ingestion and transport by the human malaria parasite Plasmodium falciparum, *J. Cell. Sci* 121, 1937-1949.
179. Sherman, I. W. (1977) Amino acid metabolism and protein synthesis in malarial parasites, *Bull. World Health Organ.* 55, 265-276.
180. Esposito, A., Tiffert, T., Mauritz, J. M., Schlachter, S., Bannister, L. H., Kaminski, C. F., et Lew, V. L. (2008) FRET imaging of hemoglobin concentration in Plasmodium falciparum-infected red cells, *PLoS One* 3, e3780.
181. Goldberg, D. E. (2005) Hemoglobin degradation, *Curr Top Microbiol Immunol* 295, 275-91.

182. Kumar, S., et Bandyopadhyay, U. (2005) Free heme toxicity and its detoxification systems in human, *Toxicol Lett* 157, 175-88.
183. Campanale, N. (2003) Identification and Characterization of Heme-interacting Proteins in the Malaria Parasite, *Plasmodium falciparum*, *Journal of Biological Chemistry* 278, 27354-27361.
184. Zerez, C. R., Lachant, N. A., Lent, K. M., et Tanaka, K. R. (1992) Decreased pyrimidine nucleoside monophosphate kinase activity in sickle erythrocytes, *Blood* 80, 512-516.
185. Famin, O., et Ginsburg, H. (2003) The treatment of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes with chloroquine leads to accumulation of ferriprotoporphyrin IX bound to particular parasite proteins and to the inhibition of the parasite's 6-phosphogluconate dehydrogenase, *Parasite* 10, 39-50.
186. Miclet, E. (2001) NMR Spectroscopic Analysis of the First Two Steps of the Pentose-Phosphate Pathway Elucidates the Role of 6-Phosphogluconolactonase, *Journal of Biological Chemistry* 276, 34840-34846.
187. Chou, A. C., et Fitch, C. D. (1981) Mechanism of hemolysis induced by ferriprotoporphyrin IX., *Journal of Clinical Investigation* 68, 672-677.
188. Solar, I., Dulitzky, J., et Shaklai, N. (1990) Hemin-promoted peroxidation of red cell cytoskeletal proteins, *Arch. Biochem. Biophys.* 283, 81-89.
189. Müller, T., Johann, L., Jannack, B., Brückner, M., Lanfranchi, D. A., Bauer, H., Sanchez, C., Yardley, V., Deregnacourt, C., Schrével, J., Lanzer, M., Schirmer, R. H., et Davioud-Charvet, E. (2011) Glutathione Reductase-Catalyzed Cascade of Redox Reactions To Bioactivate Potent Antimalarial 1,4-Naphthoquinones – A New Strategy to Combat Malarial Parasites, *Journal of the American Chemical Society* 133, 11557-11571.
190. Becker, K., Tilley, L., Vennerstrom, J. L., Roberts, D., Rogerson, S., et Ginsburg, H. (2004) Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions, *Int J Parasitol* 34, 163-89.
191. Eckman, J. R., Modler, S., Eaton, J. W., Berger, E., et Engel, R. R. (1977) Host heme catabolism in drug-sensitive and drug-resistant malaria, *J Lab Clin Med* 90, 767-70.
192. Brown, W. H. (1911) Malarial Pigment (So-Called Melanin): Its Nature and Mode of Production, *J Exp Med* 13, 290-9.
193. Sullivan, D. J. (2002) Theories on malarial pigment formation and quinoline action, *Int J Parasitol* 32, 1645-53.
194. Egan, T. J. (2001) Structure-function relationships in chloroquine and related 4-aminoquinoline antimalarials, *Mini Rev Med Chem* 1, 113-23.
195. Tilley, L., Loria, P., et Foley, M. (2001) Chloroquine and other quinoline antimalarials. In *Antimalarial Chemotherapy*, p 87-122.

196. Egan, T. J., Combrinck, J. M., Egan, J., Hearne, G. R., Marques, H. M., Ntenti, S., Sewell, B. T., Smith, P. J., Taylor, D., van Schalkwyk, D. A., et Walden, J. C. (2002) Fate of haem iron in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*, *Biochem. J.* 365, 343-347.
197. Slater, A. F., et Cerami, A. (1992) Inhibition by chloroquine of a novel haem polymerase enzyme activity in malaria trophozoites, *Nature* 355, 167-9.
198. Dorn, A., Stoffel, R., Matile, H., Bubendorf, A., et Ridley, R. G. (1995) Malarial haemozoin/beta-haematin supports haem polymerization in the absence of protein, *Nature* 374, 269-271.
199. Sullivan, D. J., Gluzman, I. Y., et Goldberg, D. E. (1996) *Plasmodium* hemozoin formation mediated by histidine-rich proteins, *Science* 271, 219-22.
200. Sullivan, D. J., Gluzman, I. Y., Russell, D. G., et Goldberg, D. E. (1996) On the molecular mechanism of chloroquine's antimalarial action, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11865-70.
201. Tawk, L., Chicanne, G., Dubremetz, J.-F., Richard, V., Payrastre, B., Vial, H. J., Roy, C., et Wengelnik, K. (2010) Phosphatidylinositol 3-Phosphate, an Essential Lipid in *Plasmodium*, Localizes to the Food Vacuole Membrane and the Apicoplast, *Eukaryotic Cell* 9, 1519-1530.
202. Fitch, C. D., et Kanjanangulpan, P. (1987) The state of ferriprotoporphyrin IX in malaria pigment, *J Biol Chem* 262, 15552-5.
203. Palacpac, N. M. Q., Hiramane, Y., Mi-ichi, F., Torii, M., Kita, K., Hiramatsu, R., Horii, T., et Mitamura, T. (2004) Developmental-stage-specific triacylglycerol biosynthesis, degradation and trafficking as lipid bodies in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes, *J. Cell. Sci.* 117, 1469-1480.
204. Palacpac, N. M. Q., Hiramane, Y., Seto, S., Hiramatsu, R., Horii, T., et Mitamura, T. (2004) Evidence that *Plasmodium falciparum* diacylglycerol acyltransferase is essential for intraerythrocytic proliferation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 321, 1062-1068.
205. Jackson, K. E., Klonis, N., Ferguson, D. J., Adisa, A., Dogovski, C., et Tilley, L. (2004) Food vacuole-associated lipid bodies and heterogeneous lipid environments in the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, *Mol Microbiol* 54, 109-22.
206. Coppens, I., et Vielemeyer, O. (2005) Insights into unique physiological features of neutral lipids in Apicomplexa: from storage to potential mediation in parasite metabolic activities, *Int. J. Parasitol.* 35, 597-615.
207. Pisciotta, J. M., Coppens, I., Tripathi, A. K., Scholl, P. F., Shuman, J., Bajad, S., Shulaev, V., et Sullivan, D. J. J. (2007) The role of neutral lipid nanospheres in *Plasmodium falciparum* haem crystallization, *Biochem J* 402, 197-204.
208. Oliveira, M. F., Kycia, S. W., Gomez, A., Kosar, A. J., Bohle, D. S., Hempelmann, E., Menezes, D., Vannier-Santos, M. A., Oliveira, P. L., et Ferreira, S. T. (2005) Structural and morphological characterization of hemozoin produced by *Schistosoma mansoni* and *Rhodnius prolixus*, *FEBS Lett.* 579, 6010-6016.
209. Corrêa Soares, J. B. R., Maya-Monteiro, C. M., Bittencourt-Cunha, P. R. B., Atella, G. C., Lara, F. A., d' Avila, J. C. P., Menezes, D., Vannier-Santos, M. A., Oliveira, P. L., Egan, T.

- J., et Oliveira, M. F. (2007) Extracellular lipid droplets promote hemozoin crystallization in the gut of the blood fluke *Schistosoma mansoni*, *FEBS Lett.* 581, 1742-1750.
210. Bohle, D. S., Dinnebier, R. E., Madsen, S. K., et Stephens, P. W. (1997) Characterization of the products of the heme detoxification pathway in malarial late trophozoites by X-ray diffraction, *J Biol Chem* 272, 713-6.
211. Pagola, S., Stephens, P. W., Bohle, D. S., Kosar, A. D., et Madsen, S. K. (2000) The structure of malaria pigment beta-haematin, *Nature* 404, 307-10.
212. Slater, A. F., Swiggard, W. J., Orton, B. R., Flitter, W. D., Goldberg, D. E., Cerami, A., et Henderson, G. B. (1991) An iron-carboxylate bond links the heme units of malaria pigment, *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 325-9.
213. Adams, P. A., Berman, P. A., Egan, T. J., Marsh, P. J., et Silver, J. (1996) The iron environment in heme and heme-antimalarial complexes of pharmacological interest, *J Inorg Biochem* 63, 69-77.
214. Webster, G. T., Tilley, L., Deed, S., McNaughton, D., et Wood, B. R. (2008) Resonance Raman spectroscopy can detect structural changes in haemozoin (malaria pigment) following incubation with chloroquine in infected erythrocytes, *FEBS Lett* 582, 1087-92.
215. Bohle, D. S., Conklin, B. J., Cox, D., Madsen, S. K., Paulson, S., Stephens, P. W., et Yee, G. T. (1994) Structural and Spectroscopic Studies of β -Hematin (the Heme Coordination Polymer in Malaria Pigment), *ACS Symposium Series* 572, 497-515.
216. Egan, T. J. (2008) Haemozoin formation, *Mol Biochem Parasitol* 157, 127-36.
217. Sadasivan, N., Eberspaecher, H. I., Fuchsman, W. H., et Caughey, W. S. (1969) Substituted deuteroporphyrins. VI. Ligand-exchange and dimerization reactions of deuterohemins, *Biochemistry* 8, 534-41.
218. Egan, T. J., Chen, J. Y., de Villiers, K. A., Mabothe, T. E., Naidoo, K. J., Ncokazi, K. K., Langford, S. J., McNaughton, D., Pandiancherri, S., et Wood, B. R. (2006) Haemozoin (beta-haematin) biomineralization occurs by self-assembly near the lipid/water interface, *FEBS Lett* 580, 5105-10.
219. Klonis, N., Dilanian, R., Hanssen, E., Darmanin, C., Streltsov, V., Deed, S., Quiney, H., et Tilley, L. (2010) Hematin-hematin self-association states involved in the formation and reactivity of the malaria parasite pigment, hemozoin, *Biochemistry* 49, 6804-11.
220. Straasø, T., Kapishnikov, S., Kato, K., Takata, M., Als-Nielsen, J., et Leiserowitz, L. (2011) The Role of the Four Stereoisomers of the Heme Fe–O Cyclic Dimer in the Crystalline Phase Behavior of Synthetic Hemozoin: Relevance to Native Hemozoin Crystallization, *Crystal Growth & Design* 11, 3342-3350.
221. Jani, D., Nagarkatti, R., Beatty, W., Angel, R., Slebodnick, C., Andersen, J., Kumar, S., et Rathore, D. (2008) HDP—A Novel Heme Detoxification Protein from the Malaria Parasite, *PLoS Pathogens* (Kim, K., Éd.) 4, e1000053.
222. Carney, C. K., Schrimpe, A. C., Halfpenny, K., Harry, R. S., Miller, C. M., Broncel, M., Sewell, S. L., Schaff, J. E., Deol, R., Carter, M. D., et Wright, D. W. (2006) The basis of the immunomodulatory activity of malaria pigment (hemozoin), *J Biol Inorg Chem* 11, 917-29.

223. Wagner, H. (2010) Hemozoin: malaria's « built-in » adjuvant and TLR9 agonist, *Cell Host Microbe* 7, 5-6.
224. Urban, B. C., et Todryk, S. (2006) Malaria pigment paralyzes dendritic cells, *J Biol* 5, 4.
225. Parroche, P., Lauw, F. N., Goutagny, N., Latz, E., Monks, B. G., Visintin, A., Halmen, K. A., Lamphier, M., Olivier, M., Bartholomeu, D. C., Gazzinelli, R. T., et Golenbock, D. T. (2007) Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9, *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 1919-24.
226. Arese, P., et Schwarzer, E. (1997) Malarial pigment (haemozoin): a very active « inert » substance, *Ann Trop Med Parasitol* 91, 501-16.
227. Jaramillo, M., Bellemare, M. J., Martel, C., Shio, M. T., Contreras, A. P., Godbout, M., Roger, M., Gaudreault, E., Gosselin, J., Bohle, D. S., et Olivier, M. (2009) Synthetic Plasmodium-like hemozoin activates the immune response: a morphology - function study, *PLoS One* 4, e6957.
228. Walczak, M., Lawniczak-Jablonska, K., Sienkiewicz, A., Demchenko, I. N., Piskorska, E., Chatain, G., et Bohle, D. S. (2005) Local environment of iron in malarial pigment and its substitute β -hematin, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B* 238, 32-38.
229. Weissbuch, I., et Leiserowitz, L. (2008) Interplay Between Malaria, Crystalline Hemozoin Formation, and Antimalarial Drug Action and Design, *Chemical reviews* 108, 4899-4914.
230. Dubar, F., Egan, T. J., Pradines, B., Kuter, D., Ncokazi, K. K., Forge, D., Paul, J. F., Pierrot, C., Kalamou, H., Khalife, J., Buisine, E., Rogier, C., Vezin, H., Forfar, I., Slomianny, C., Trivelli, X., Kapishnikov, S., Leiserowitz, L., Dive, D., et Biot, C. (2010) The Antimalarial Ferroquine: Role of the Metal and Intramolecular Hydrogen Bond in Activity and Resistance, *ACS Chem Biol*.
231. Kapishnikov, S., Weiner, A., Shimoni, E., Guttman, P., Schneider, G., Dahan-Pasternak, N., Dzikowski, R., Leiserowitz, L., et Elbaum, M. (2012) Oriented nucleation of hemozoin at the digestive vacuole membrane in *Plasmodium falciparum*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 11188-11193.
232. Kapishnikov, S., Berthing, T., Hviid, L., Dierolf, M., Menzel, A., Pfeiffer, F., Als-Nielsen, J., et Leiserowitz, L. (2012) Aligned hemozoin crystals in curved clusters in malarial red blood cells revealed by nanoprobe X-ray Fe fluorescence and diffraction, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 11184-11187.
233. Cohen, S. N., et Yielding, K. L. (1965) Spectrophotometric Studies of the Interaction of Chloroquine with Deoxyribonucleic Acid, *J Biol Chem* 240, 3123-31.
234. Schlesinger, P. H., Krogstad, D. J., et Herwaldt, B. L. (1988) Antimalarial agents: mechanisms of action, *Antimicrob Agents Chemother* 32, 793-8.
235. Pradines, B., Alibert, S., Houdoin, C., Santelli-Rouvier, C., Mosnier, J., Fusai, T., Rogier, C., Barbe, J., et Parzy, D. (2002) In vitro increase in chloroquine accumulation induced by dihydroethano- and ethenoanthracene derivatives in *Plasmodium falciparum*-parasitized erythrocytes, *Antimicrob Agents Chemother* 46, 2061-8.

236. Egan, T. J. (2006) Interactions of quinoline antimalarials with hematin in solution, *J Inorg Biochem* 100, 916-26.
237. Bray, P. G., Janneh, O., Raynes, K. J., Mungthin, M., Ginsburg, H., et Ward, S. A. (1999) Cellular uptake of chloroquine is dependent on binding to ferriprotoporphyrin IX and is independent of NHE activity in *Plasmodium falciparum*, *J Cell Biol* 145, 363-76.
238. Krogstad, D. J., Gluzman, I. Y., Kyle, D. E., Oduola, A. M., Martin, S. K., Milhous, W. K., et Schlesinger, P. H. (1987) Efflux of chloroquine from *Plasmodium falciparum*: mechanism of chloroquine resistance, *Science* 238, 1283-1285.
239. Bray, P. G., Mungthin, M., Ridley, R. G., et Ward, S. A. (1998) Access to hematin: the basis of chloroquine resistance, *Mol Pharmacol* 54, 170-9.
240. Fidock, D. A., Nomura, T., Cooper, R. A., Su, X., Talley, A. K., et Wellems, T. E. (2000) Allelic modifications of the *cg2* and *cg1* genes do not alter the chloroquine response of drug-resistant *Plasmodium falciparum*, *Mol Biochem Parasitol* 110, 1-10.
241. Sanchez, C. P., Wunsch, S., et Lanzer, M. (1997) Identification of a chloroquine importer in *Plasmodium falciparum*. Differences in import kinetics are genetically linked with the chloroquine-resistant phenotype, *J Biol Chem* 272, 2652-8.
242. Wunsch, S., Sanchez, C. P., Gekle, M., Grosse-Wortmann, L., Wiesner, J., et Lanzer, M. (1998) Differential stimulation of the Na⁺/H⁺ exchanger determines chloroquine uptake in *Plasmodium falciparum*, *J Cell Biol* 140, 335-45.
243. Egan, T. J., Ross, D. C., et Adams, P. A. (1994) Quinoline anti-malarial drugs inhibit spontaneous formation of beta-haematin (malaria pigment), *FEBS Lett.* 352, 54-57.
244. COHEN, S. N., PHIFER, K. O., et YIELDING, K. L. (1964) COMPLEX FORMATION BETWEEN CHLOROQUINE AND FERRIHAEMIC ACID IN VITRO, AND ITS EFFECT ON THE ANTIMALARIAL ACTION OF CHLOROQUINE, *Nature* 202, 805-806.
245. Egan, T. J., Mavuso, W. W., Ross, D. C., et Marques, H. M. (1997) Thermodynamic factors controlling the interaction of quinoline antimalarial drugs with ferriprotoporphyrin IX, *J Inorg Biochem* 68, 137-45.
246. Egan, T. J., et Ncokazi, K. K. (2004) Effects of solvent composition and ionic strength on the interaction of quinoline antimalarials with ferriprotoporphyrin IX, *J Inorg Biochem* 98, 144-52.
247. Chou, A. C., Chevli, R., et Fitch, C. D. (1980) Ferriprotoporphyrin IX fulfills the criteria for identification as the chloroquine receptor of malaria parasites, *Biochemistry* 19, 1543-9.
248. Moreau, S., Perly, B., et Biguet, J. (1982) [Interaction of chloroquine with ferriprotoporphyrin IX. Nuclear magnetic resonance study], *Biochimie* 64, 1015-25.
249. Moreau, S., Perly, B., Chachaty, C., et Deleuze, C. (1985) A nuclear magnetic resonance study of the interactions of antimalarial drugs with porphyrins, *Biochim. Biophys. Acta* 840, 107-116.

250. Dorn, A., Vippagunta, S. R., Matile, H., Jaquet, C., Vennerstrom, J. L., et Ridley, R. G. (1998) An assessment of drug-haematin binding as a mechanism for inhibition of haematin polymerisation by quinoline antimalarials, *Biochem. Pharmacol.* 55, 727-736.
251. Constantinidis, I., et Satterlee, J. D. (1988) UV-visible and carbon NMR studies of chloroquine binding to urohemin I chloride and uroporphyrin I in aqueous solutions, *Journal of American Chemical Society* 110, 4391-4395.
252. Chong, C. R., et Sullivan, D. J., Jr. (2003) Inhibition of heme crystal growth by antimalarials and other compounds: implications for drug discovery, *Biochem. Pharmacol.* 66, 2201-2212.
253. Egan, T. J., et Ncokazi, K. K. (2005) Quinoline antimalarials decrease the rate of beta-hematin formation, *J Inorg Biochem* 99, 1532-9.
254. Crespo, M. P., Tilley, L., et Klonis, N. (2010) Solution behavior of hematin under acidic conditions and implications for its interactions with chloroquine, *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* 15, 1009-1022.
255. Gligorijevic, B., McAllister, R., Urbach, J. S., et Roepe, P. D. (2006) Spinning Disk Confocal Microscopy of Live, Intraerythrocytic Malarial Parasites. 1. Quantification of Hemozoin Development for Drug Sensitive versus Resistant Malaria †, *Biochemistry* 45, 12400-12410.
256. WHO. (1967) Chemotherapy of Malaria - Report of a WHO Scientific Group, p 1-91.
257. Bruce-Chwatt, L. J. (1986) Chemotherapy of malaria, World Health Organization ; WHO Publications Center USA, Geneva; Albany, NY.
258. Payne, D. (1987) Spread of chloroquine resistance in Plasmodium falciparum, *Parasitol. Today (Regul. Ed.)* 3, 241-246.
259. Wellems, T. E., et Plowe, C. V. (2001) Chloroquine-resistant malaria, *J. Infect. Dis.* 184, 770-776.
260. Fitch, C. D. (1969) Chloroquine resistance in malaria: a deficiency of chloroquine binding, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 64, 1181-1187.
261. Saliba, K. J., Folb, P. I., et Smith, P. J. (1998) Role for the plasmodium falciparum digestive vacuole in chloroquine resistance, *Biochem. Pharmacol.* 56, 313-320.
262. Bray, P. G., Martin, R. E., Tilley, L., Ward, S. A., Kirk, K., et Fidock, D. A. (2005) Defining the role of PfCRT in Plasmodium falciparum chloroquine resistance, *Mol Microbiol* 56, 323-33.
263. Geary, T. G., Jensen, J. B., et Ginsburg, H. (1986) Uptake of [3H]chloroquine by drug-sensitive and -resistant strains of the human malaria parasite Plasmodium falciparum, *Biochem. Pharmacol.* 35, 3805-3812.
264. Martin, S. K., Oduola, A. M., et Milhous, W. K. (1987) Reversal of chloroquine resistance in Plasmodium falciparum by verapamil, *Science* 235, 899-901.

265. Bray, P. G., Howells, R. E., Ritchie, G. Y., et Ward, S. A. (1992) Rapid chloroquine efflux phenotype in both chloroquine-sensitive and chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. A correlation of chloroquine sensitivity with energy-dependent drug accumulation, *Biochem. Pharmacol.* 44, 1317-1324.
266. Hawley, S. R., Bray, P. G., Mungthin, M., Atkinson, J. D., O'Neill, P. M., et Ward, S. A. (1998) Relationship between Antimalarial Drug Activity, Accumulation, and Inhibition of Heme Polymerization in *Plasmodium falciparum* In Vitro, *Antimicrob Agents Chemother* 42, 682-686.
267. Roepe, P. D. (2011) PfCRT-Mediated Drug Transport in Malarial Parasites, *Biochemistry* 50, 163-171.
268. Organisation mondiale de la santé. (2007) Directives pour le traitement du paludisme., Organisation mondiale de la santé, Genève.
269. Wellems, T. E., Walker-Jonah, A., et Panton, L. J. (1991) Genetic mapping of the chloroquine-resistance locus on *Plasmodium falciparum* chromosome 7, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 3382-3386.
270. Fidock, D. A., Nomura, T., Talley, A. K., Cooper, R. A., Dzekunov, S. M., Ferdig, M. T., Ursos, L. M., Sidhu, A. B., Naudé, B., Deitsch, K. W., Su, X. Z., Wootton, J. C., Roepe, P. D., et Wellems, T. E. (2000) Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance, *Mol. Cell* 6, 861-871.
271. Djimde, A., Doumbo, O. K., Cortese, J. F., Kayentao, K., Doumbo, S., Diourte, Y., Dicko, A., Su, X. Z., Nomura, T., Fidock, D. A., Wellems, T. E., Plowe, C. V., et Coulibaly, D. (2001) A molecular marker for chloroquine-resistant *falciparum* malaria, *N Engl J Med* 344, 257-63.
272. Wellems, T. E. (2002) *Plasmodium* chloroquine resistance and the search for a replacement antimalarial drug, *Science* 298, 124-6.
273. Martin, R. E., et Kirk, K. (2004) The Malaria Parasite's Chloroquine Resistance Transporter is a Member of the Drug/Metabolite Transporter Superfamily, *Mol Biol Evol* 21, 1938-1949.
274. Valderramos, S. G., et Fidock, D. A. (2006) Transporters involved in resistance to antimalarial drugs, *Trends Pharmacol Sci* 27, 594-601.
275. Howard, E. M., Zhang, H., et Roepe, P. D. (2002) A novel transporter, PfCRT, confers antimalarial drug resistance, *J Membr Biol* 190, 1-8.
276. Tran, C. V., et Saier, M. H. (2004) The principal chloroquine resistance protein of *Plasmodium falciparum* is a member of the drug/metabolite transporter superfamily, *Microbiology* 150, 1-3.
277. Sanchez, C. P., Stein, W. D., et Lanzer, M. (2007) Is PfCRT a channel or a carrier? Two competing models explaining chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*, *Trends Parasitol* 23, 332-9.

278. Sanchez, C. P., Rohrbach, P., McLean, J. E., Fidock, D. A., Stein, W. D., et Lanzer, M. (2007) Differences in trans-stimulated chloroquine efflux kinetics are linked to PfCRT in *Plasmodium falciparum*, *Mol Microbiol* 64, 407-20.
279. Summers, R. L., Nash, M. N., et Martin, R. E. (2012) Know your enemy: understanding the role of PfCRT in drug resistance could lead to new antimalarial tactics, *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*.
280. Lakshmanan, V., Bray, P. G., Verdier-Pinard, D., Johnson, D. J., Horrocks, P., Muhle, R. A., Alakpa, G. E., Hughes, R. H., Ward, S. A., Krogstad, D. J., Sidhu, A. B. S., et Fidock, D. A. (2005) A critical role for PfCRT K76T in *Plasmodium falciparum* verapamil-reversible chloroquine resistance, *EMBO J.* 24, 2294-2305.
281. Chaijaroenkul, W., Ward, S. A., Mungthin, M., Johnson, D., Owen, A., Bray, P. G., et Na-Bangchang, K. (2011) Sequence and gene expression of chloroquine resistance transporter (pfert) in the association of in vitro drugs resistance of *Plasmodium falciparum*, *Malar. J.* 10, 42.
282. Sanchez, C. P., Dave, A., Stein, W. D., et Lanzer, M. (2010) Transporters as mediators of drug resistance in *Plasmodium falciparum*, *Int. J. Parasitol.* 40, 1109-1118.
283. Summers, R. L., et Martin, R. E. (2010) Functional characteristics of the malaria parasite's « chloroquine resistance transporter »: implications for chemotherapy, *Virulence* 1, 304-308.
284. Bray, P. G., Mungthin, M., Hastings, I. M., Biagini, G. A., Saidu, D. K., Lakshmanan, V., Johnson, D. J., Hughes, R. H., Stocks, P. A., O'Neill, P. M., Fidock, D. A., Warhurst, D. C., et Ward, S. A. (2006) PfCRT and the trans-vacuolar proton electrochemical gradient: regulating the access of chloroquine to ferriprotoporphyrin IX, *Mol. Microbiol.* 62, 238-251.
285. Sanchez, C. P., McLean, J. E., Rohrbach, P., Fidock, D. A., Stein, W. D., et Lanzer, M. (2005) Evidence for a pfert-associated chloroquine efflux system in the human malarial parasite *Plasmodium falciparum*, *Biochemistry* 44, 9862-9870.
286. Naudé, B., Brzostowski, J. A., Kimmel, A. R., et Wellems, T. E. (2005) Dictyostelium discoideum expresses a malaria chloroquine resistance mechanism upon transfection with mutant, but not wild-type, *Plasmodium falciparum* transporter PfCRT, *J. Biol. Chem.* 280, 25596-25603.
287. Martin, R. E., Marchetti, R. V., Cowan, A. I., Howitt, S. M., Bröer, S., et Kirk, K. (2009) Chloroquine transport via the malaria parasite's chloroquine resistance transporter, *Science* 325, 1680-1682.
288. Johnson, D. J., Fidock, D. A., Mungthin, M., Lakshmanan, V., Sidhu, A. B. S., Bray, P. G., et Ward, S. A. (2004) Evidence for a Central Role for PfCRT in Conferring *Plasmodium falciparum* Resistance to Diverse Antimalarial Agents, *Molecular Cell* 15, 867-877.
289. Ursos, L. M., Dzekunov, S. M., et Roepe, P. D. (2000) The effects of chloroquine and verapamil on digestive vacuolar pH of *P. falciparum* either sensitive or resistant to chloroquine, *Mol Biochem Parasitol* 110, 125-34.

290. Ursos, L. M., DuBay, K. F., et Roepe, P. D. (2001) Antimalarial drugs influence the pH dependent solubility of heme via apparent nucleation phenomena, *Mol Biochem Parasitol* 112, 11-7.
291. Klonis, N., Tan, O., Jackson, K., Goldberg, D., Klemba, M., et Tilley, L. (2007) Evaluation of pH during cytosomal endocytosis and vacuolar catabolism of haemoglobin in *Plasmodium falciparum*, *Biochem J* 407, 343-54.
292. Waller, K. L., Muhle, R. A., Ursos, L. M., Horrocks, P., Verdier-Pinard, D., Sidhu, A. B. S., Fujioka, H., Roepe, P. D., et Fidock, D. A. (2003) Chloroquine resistance modulated in vitro by expression levels of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter, *J. Biol. Chem.* 278, 33593-33601.
293. Martin, R. E., et Kirk, K. (2004) The malaria parasite's chloroquine resistance transporter is a member of the drug/metabolite transporter superfamily, *Mol. Biol. Evol.* 21, 1938-1949.
294. Carlton, J. M., Fidock, D. A., Djimdé, A., Plowe, C. V., et Wellems, T. E. (2001) Conservation of a novel vacuolar transporter in *Plasmodium* species and its central role in chloroquine resistance of *P. falciparum*, *Curr. Opin. Microbiol.* 4, 415-420.
295. van Schalkwyk, D. A., et Egan, T. J. (2006) Quinoline-resistance reversing agents for the malaria parasite *Plasmodium falciparum*, *Drug Resist. Updat.* 9, 211-226.
296. Foote, S. J., Thompson, J. K., Cowman, A. F., et Kemp, D. J. (1989) Amplification of the multidrug resistance gene in some chloroquine-resistant isolates of *P. falciparum*, *Cell* 57, 921-30.
297. Wilson, C. M., Serrano, A. E., Wasley, A., Bogenschutz, M. P., Shankar, A. H., et Wirth, D. F. (1989) Amplification of a gene related to mammalian *mdr* genes in drug-resistant *Plasmodium falciparum*, *Science* 244, 1184-6.
298. Foote, S. J., Kyle, D. E., Martin, R. K., Oduola, A. M., Forsyth, K., Kemp, D. J., et Cowman, A. F. (1990) Several alleles of the multidrug-resistance gene are closely linked to chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*, *Nature* 345, 255-8.
299. Basco, L. K., Le Bras, J., Rhoades, Z., et Wilson, C. M. (1995) Analysis of *pfmdr1* and drug susceptibility in fresh isolates of *Plasmodium falciparum* from subsaharan Africa, *Mol. Biochem. Parasitol.* 74, 157-166.
300. Barnes, D. A., Foote, S. J., Galatis, D., Kemp, D. J., et Cowman, A. F. (1992) Selection for high-level chloroquine resistance results in deamplification of the *pfmdr1* gene and increased sensitivity to mefloquine in *Plasmodium falciparum*, *EMBO J.* 11, 3067-3075.
301. Rason, M.-A., Andrianantenaina, H. B., Ariey, F., Raveloson, A., Domarle, O., et Randrianarivejosia, M. (2007) Prevalent *pfmdr1* n86y mutant *Plasmodium falciparum* in Madagascar despite absence of *pfert* mutant strains, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76, 1079-1083.
302. Wellems, T. E., Panton, L. J., Gluzman, I. Y., do Rosario, V. E., Gwadz, R. W., Walker-Jonah, A., et Krogstad, D. J. (1990) Chloroquine resistance not linked to *mdr*-like genes in a *Plasmodium falciparum* cross, *Nature* 345, 253-5.

303. Reed, M. B., Saliba, K. J., Caruana, S. R., Kirk, K., et Cowman, A. F. (2000) Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*, *Nature* 403, 906-9.
304. Duraisingh, M. T., et Refour, P. (2005) Multiple drug resistance genes in malaria -- from epistasis to epidemiology, *Mol Microbiol* 57, 874-7.
305. Cowman, A. F., Galatis, D., et Thompson, J. K. (1994) Selection for mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* is linked to amplification of the *pfmdr1* gene and cross-resistance to halofantrine and quinine, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1143-7.
306. Sidhu, A. B., Valderramos, S. G., et Fidock, D. A. (2005) *pfmdr1* mutations contribute to quinine resistance and enhance mefloquine and artemisinin sensitivity in *Plasmodium falciparum*, *Mol Microbiol* 57, 913-26.
307. Wilson, C. M., Volkman, S. K., Thaithong, S., Martin, R. K., Kyle, D. E., Milhous, W. K., et Wirth, D. F. (1993) Amplification of *pfmdr 1* associated with mefloquine and halofantrine resistance in *Plasmodium falciparum* from Thailand, *Mol Biochem Parasitol* 57, 151-60.
308. Sanchez, C. P., Rotmann, A., Stein, W. D., et Lanzer, M. (2008) Polymorphisms within PfMDR1 alter the substrate specificity for anti-malarial drugs in *Plasmodium falciparum*, *Mol Microbiol* 70, 786-98.
309. Saliba, K. J., Lehane, A. M., et Kirk, K. (2008) A polymorphic drug pump in the malaria parasite, *Mol Microbiol* 70, 775-9.
310. Basco, L. K., et Ringwald, P. (1999) Molecular epidemiology of malaria in Yaounde, Cameroon V. analysis of the omega repetitive region of the *plasmodium falciparum* CG2 gene and chloroquine resistance, *Am J Trop Med Hyg* 61, 807-13.
311. Durand, R., Gabbett, E., Di Piazza, J. P., Delabre, J. F., et Le Bras, J. (1999) Analysis of kappa and omega repeats of the *cg2* gene and chloroquine susceptibility in isolates of *Plasmodium falciparum* from sub-Saharan Africa, *Mol Biochem Parasitol* 101, 185-97.
312. Ridley, R. G. (1998) Malaria: dissecting chloroquine resistance, *Curr. Biol.* 8, R346-349.
313. Raj, D. K., Mu, J., Jiang, H., Kabat, J., Singh, S., Sullivan, M., Fay, M. P., McCutchan, T. F., et Su, X.-Z. (2009) Disruption of a *Plasmodium falciparum* multidrug resistance-associated protein (PfMRP) alters its fitness and transport of antimalarial drugs and glutathione, *J. Biol. Chem.* 284, 7687-7696.
314. Mu, J., Ferdig, M. T., Feng, X., Joy, D. A., Duan, J., Furuya, T., Subramanian, G., Aravind, L., Cooper, R. A., Wootton, J. C., Xiong, M., et Su, X. (2003) Multiple transporters associated with malaria parasite responses to chloroquine and quinine, *Mol. Microbiol.* 49, 977-989.
315. Kealy, T. J., et Pauson, P. L. (1951) A New Type of Organo-Iron Compound, *Nature* 168, 1039-1040.

316. Geoffrey Wilkinson, Rosenblum, M., M.C. Whiting, et R.B. Woodward. (1952) The structure of iron bis-cyclopentadienyl, *Journal of the American Chemical Society* 74, 2125-2126.
317. Brock, C. P., et Fu, Y. (1997) Rigid-Body Disorder Models for the High-Temperature Phase of Ferrocene, *Acta Crystallographica Section B Structural Science* 53, 928-938.
318. Hillard, E. A., Vessières, A., et Jaouen, G. (2010) Ferrocene Functionalized Endocrine Modulators as Anticancer Agents. In *Medicinal Organometallic Chemistry* (Jaouen, G., et Metzler-Nolte, N., Éd.), p 81-117, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
319. Loev, B., et Minerva Flores. (1961) Note- Ferrocene Derivatives 26, 3595.
320. Edward, E., et Marr G. (1977) Organometallic derivatives of penicillin.
321. Edwards, E. I., Epton, R., et Marr, G. (1975) Organometallic derivatives of penicillins and cephalosporins a new class of semi-synthetic antibiotics, *Journal of Organometallic Chemistry* 85, C23-C25.
322. Fiorina, V. J., Dubois, R. J., et Brynes, S. (1978) Ferrocenyl polyamines as agents for the chemoimmunotherapy of cancer, *J. Med. Chem.* 21, 393-395.
323. Köpf-Maier, P., Köpf, H., et Neuse, E. W. (1984) Ferrocenium Salts? The First Antineoplastic Iron Compounds, *Angewandte Chemie International Edition in English* 23, 456-457.
324. Top, S., Tang, J., Vessieres, A., Carrez, D., Provot, C., et Jaouen, G. (1996) Ferrocenyl hydroxytamoxifen: a prototype for a new range of oestradiol receptor site-directed cytotoxics, *Chemical Communications* 955.
325. Osella, D., Ferrali, M., Zanello, P., Laschi, F., Fontani, M., Nervi, C., et Cavigiolio, G. (2000) On the mechanism of the antitumor activity of ferrocenium derivatives, *Inorganica Chimica Acta* 306, 42-48.
326. Tabbì, G., Cassino, C., Cavigiolio, G., Colangelo, D., Ghiglia, A., Viano, I., et Osella, D. (2002) Water stability and cytotoxic activity relationship of a series of ferrocenium derivatives. ESR insights on the radical production during the degradation process, *J. Med. Chem.* 45, 5786-5796.
327. Osella, D., Mahboobi, H., Colangelo, D., Cavigiolio, G., Vessières, A., et Jaouen, G. (2005) FACS analysis of oxidative stress induced on tumour cells by SERMs, *Inorganica Chimica Acta* 358, 1993-1998.
328. Neuse, E. W. (2005) Macromolecular Ferrocene Compounds as Cancer Drug Models, *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials* 15, 3-31.
329. Cable, E. E., Connor, J. R., et Isom, H. C. (1998) Accumulation of iron by primary rat hepatocytes in long-term culture: changes in nuclear shape mediated by non-transferrin-bound forms of iron, *Am. J. Pathol.* 152, 781-792.

330. Hillard, E., Vessières, A., Thouin, L., Jaouen, G., et Amatore, C. (2005) Ferrocene-mediated proton-coupled electron transfer in a series of ferrocifen-type breast-cancer drug candidates, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* *45*, 285-290.
331. Hillard, E. A., Pigeon, P., Vessières, A., Amatore, C., et Jaouen, G. (2007) The influence of phenolic hydroxy substitution on the electron transfer and anti-cancer properties of compounds based on the 2-ferrocenyl-1-phenyl-but-1-ene motif, *Dalton Trans* 5073-5081.
332. Dive, D., et Biot, C. (2008) Ferrocene conjugates of chloroquine and other antimalarials: the development of ferroquine, a new antimalarial, *ChemMedChem* *3*, 383-91.
333. Blackie, M. A., Beagley, P., et Croft, S. L. (2007) Metallocene-based antimalarials: an exploration into the influence of the ferrocenyl moiety on in vitro antimalarial activity in chloroquine-sensitive and chloroquine-resistant strains of *Plasmodium falciparum*., *Med. Chem.* *15*, 6510-6516.
334. Bantle, J. A., Burton, D. T., Dawson, D. A., Dumont, J. N., Finch, R. A., Fort, D. J., Linder, G., Rayburn, J. R., Buchwalter, D., Maurice, M. A., Fort, D. J., Linder, G., et Buchwalter, D. (1994) Initial interlaboratory validation study of FETAX: Phase I testing, *Journal of Applied Toxicology* *14*, 213-223.
335. Maron, D. M., et Ames, B. N. (1983) Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutat Res* *113*, 173-215.
336. Chatterjee, T., Mukhopadhyay, A., Khan, K. A., et Giri, A. K. (1998) Comparative mutagenic and genotoxic effects of three antimalarial drugs, chloroquine, primaquine and amodiaquine, *Mutagenesis* *13*, 619-24.
337. Delhaes, L., Abessolo, H., Biot, C., Berry, L., Delcourt, P., Maciejewski, L., Brocard, J., Camus, D., et Dive, D. (2001) In vitro and in vivo antimalarial activity of ferrochloroquine, a ferrocenyl analogue of chloroquine against chloroquine-resistant malaria parasites, *Parasitol Res* *87*, 239-44.
338. Biot, C., Glorian, G., Maciejewski, L., Brocard, J., Domarle, O., Blampain, G., Millet, P., Georges, A. J., Abessolo, H., Dive, D., et Lebibi, J. (1997) Synthesis and Antimalarial Activity in Vitro and in Vivo of a New Ferrocene-Chloroquine Analogue, *J Med Chem* *40*, 3715-3718.
339. Domarle, O., Blampain, G., Agnani, H., Nzadiyabi, T., Lebibi, J., Brocard, J., Maciejewski, L., Biot, C., Georges, A. J., et Millet, P. (1998) In vitro antimalarial activity of a new organometallic analog, ferrocene-chloroquine, *Antimicrob Agents Chemother* *42*, 540-4.
340. Beagley, P., Blackie, M. A. L., Chibale, K., Clarkson, C., Meijboom, R., Moss, J. R., Smith, P. J., et Su, H. (2003) Synthesis and antiplasmodial activity in vitro of new ferrocene chloroquine-analogues., *Dalton Transactions* *15*, 3046-3051.
341. Beagley, P., Blackie, M. A. L., Chibale, K., Clarkson, C., Moss, J. R., et Smith, P. J. (2002) Synthesis and antimalarial activity in vitro of new ruthenocene-chloroquine analogues, *Dalton Transactions* *23*, 4426-4433.

342. Henry, M., Briolant, S., Fontaine, A., Mosnier, J., Baret, E., Amalvict, R., Fusai, T., Fraisse, L., Rogier, C., et Pradines, B. (2008) In Vitro Activity of Ferroquine Is Independent of Polymorphisms in Transport Protein Genes Implicated in Quinoline Resistance in *Plasmodium falciparum*, *Antimicrob Agents Chemother* 52, 2755-2759.
343. Peters, W. (1975) The chemotherapy of rodent malaria, XXII. The value of drug-resistant strains of *P. berghei* in screening for blood schizontocidal activity., *Ann Trop Med Parasitol* 69, 155-171.
344. Delhaes, L., Biot, C., Berry, L., Delcourt, P., Maciejewski, L. A., Camus, D., Brocard, J. S., et Dive, D. (2002) Synthesis of ferroquine enantiomers: first investigation of effects of metallocenic chirality upon antimalarial activity and cytotoxicity, *Chembiochem* 3, 418-23.
345. Atteke, C., Ndong, J. M., Aubouy, A., Maciejewski, L., Brocard, J., Lebibi, J., et Deloron, P. (2003) In vitro susceptibility to a new antimalarial organometallic analogue, ferroquine, of *Plasmodium falciparum* isolates from the Haut-Ogooué region of Gabon, *J Antimicrob Chemother* 51, 1021-1024.
346. Kreidenweiss, A., Kreamsner, P. G., Dietz, K., et Mordmuller, B. (2006) In vitro activity of ferroquine (SAR97193) is independent of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*, *Am J Trop Med Hyg* 75, 1178-81.
347. Pradines, B., Fusai, T., Daries, W., Lalogue, V., Rogier, C., Millet, P., Panconi, E., Kombila, M., et Parzy, D. (2001) Ferrocene-chloroquine analogues as antimalarial agents: in vitro activity of ferrochloroquine against 103 Gabonese isolates of *Plasmodium falciparum*, *J Antimicrob Chemother* 48, 179-84.
348. Pradines, B., Tall, A., Rogier, C., Spiegel, A., Mosnier, J., Marrama, L., Fusai, T., Millet, P., Panconi, E., Trape, J. F., et Parzy, D. (2002) In vitro activities of ferrochloroquine against 55 Senegalese isolates of *Plasmodium falciparum* in comparison with those of standard antimalarial drugs, *Tropical Medicine & International Health* 7, 265-270.
349. Chim, P., Lim, P., Sem, R., Nhem, S., Maciejewski, L., et Fandeur, T. (2004) The in-vitro antimalarial activity of ferrochloroquine, measured against Cambodian isolates of *Plasmodium falciparum*, *Ann Trop Med Parasitol* 98, 419-424.
350. Biot, C., Daher, W., Chavain, N., Fandeur, T., Khalife, J., Dive, D., et De Clercq, E. (2006) Design and synthesis of hydroxyferroquine derivatives with antimalarial and antiviral activities, *J Med Chem* 49, 2845-9.
351. Biot, C., Daher, W., Ndiaye, C. M., Melnyk, P., Pradines, B., Chavain, N., Pellet, A., Fraisse, L., Pelinski, L., Jarry, C., Brocard, J., Khalife, J., Forfar-Bares, I., et Dive, D. (2006) Probing the role of the covalent linkage of ferrocene into a chloroquine template, *J Med Chem* 49, 4707-14.
352. Barends, M., Jaidee, A., Khaohirun, N., Singhasivanon, P., et Nosten, F. (2007) In vitro activity of ferroquine (SSR 97193) against *Plasmodium falciparum* isolates from the Thai-Burmese border, *Malar J* 6, 81.
353. Eyase, F. L., Akala, H. M., Johnson, J. D., et Walsh, D. S. (2011) Inhibitory Activity of Ferroquine, versus Chloroquine, against Western Kenya *Plasmodium falciparum* Field

- Isolates Determined by a SYBR Green I In Vitro Assay, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 85, 984-988.
354. Daher, W., Pelinski, L., Klieber, S., Sadoun, F., Meunier, V., Bourrie, M., Biot, C., Guillou, F., Fabre, G., Brocard, J., Fraisse, L., Maffrand, J. P., Khalife, J., et Dive, D. (2006) In vitro metabolism of ferroquine (SSR97193) in animal and human hepatic models and antimalarial activity of major metabolites on *Plasmodium falciparum*, *Drug Metab Dispos* 34, 667-82.
355. Henry, M., Briolant, S., Fontaine, A., Mosnier, J., Baret, E., Amalvict, R., Fusai, T., Fraisse, L., Rogier, C., et Pradines, B. (2008) In vitro activity of ferroquine is independent of polymorphisms in transport protein genes implicated in quinoline resistance in *Plasmodium falciparum*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 2755-2759.
356. Marfurt, J., Chalfein, F., Prayoga, P., Wabiser, F., Kenangalem, E., Piera, K. A., MacHunter, B., Tjitra, E., Anstey, N. M., et Price, R. N. (2011) Ex Vivo Drug Susceptibility of Ferroquine against Chloroquine-Resistant Isolates of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55, 4461-4464.
357. Biot, C., Nosten, F., Fraisse, L., Ter-Minassian, D., Khalife, J., et Dive, D. (2011) The antimalarial ferroquine: from bench to clinic, *Parasite* 18, 207-214.
358. Mombo-Ngoma, G., Supan, C., Dal-Bianco, M. P., Missinou, M. A., Matsiegui, P.-B., Ospina Salazar, C. L., Issifou, S., Ter-Minassian, D., Ramharter, M., Kombila, M., Kremsner, P. G., et Lell, B. (2011) Phase I randomized dose-ascending placebo-controlled trials of ferroquine - a candidate anti-malarial drug - in adults with asymptomatic *Plasmodium falciparum* infection, *Malar J* 10, 53.
359. Picart-Goetgheluck, S., Delacroix, O., Maciejewski, L., et Brocard, J. (2000) High-Yield Synthesis of 2-Substituted (N,N-Dimethylaminomethyl)ferrocenes., *Synthesis* 31, 1421.
360. FERREY, Vincent, MATEOS-CARO, Julia, MONDIERE, Régis, VAYRON, Philippe, et VIGNE, Sylvie. Method of synthesis of ferroquine by convergent reductive amination.
361. Biot, C., et Dive, D. (2010) Bioorganometallic Chemistry and Malaria. In *Medicinal Organometallic Chemistry* (Jaouen, G., et Metzler-Nolte, N., Éd.), p 155-193, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
362. Pham, Y. T., Nosten, F., Farinotti, R., White, N. J., et Gimenez, F. (1999) Cerebral uptake of mefloquine enantiomers in fatal cerebral malaria, *Int J Clin Pharmacol Ther* 37, 58-61.
363. Lin, G.-Q., Zhang, J.-G., et Cheng, J.-F. (2011) Overview of Chirality and Chiral Drugs. In *Chiral Drugs* (Lin, G.-Q., You, Q.-D., et Cheng, J.-F., Éd.), p 3-28, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
364. Biot, C., Taramelli, D., Forfar-Bares, I., Maciejewski, L. A., Boyce, M., Nowogrocki, G., Brocard, J. S., Basilico, N., Olliaro, P., et Egan, T. J. (2005) Insights into the mechanism of action of ferroquine. Relationship between physicochemical properties and antiplasmodial activity, *Mol Pharm* 2, 185-93.

365. Supan, C., Mombo-Ngoma, G., Dal-Bianco, M. P., Ospina Salazar, C. L., Issifou, S., Mazuir, F., Filali-Ansary, A., Biot, C., Ter-Minassian, D., Ramharter, M., Kremsner, P. G., et Lell, B. (2012) Pharmacokinetics of Ferroquine, a Novel 4-Aminoquinoline, in Asymptomatic Carriers of *Plasmodium falciparum* Infections, *Antimicrob. Agents Chemother.* *56*, 3165-3173.
366. Supan, C., Mombo-Ngoma, G., Dal-Bianco, M. P., Ospina Salazar, C. L., Issifou, S., Mazuir, F., Filali-Ansary, A., Biot, C., Ter-Minassian, D., Ramharter, M., Kremsner, P. G., et Lell, B. (2012) Pharmacokinetics of ferroquine - a second generation 4 amino-quinoline - in asymptomatic carriers of *Plasmodium falciparum* infections, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* in press.
367. Ducharme, J., et Farinotti, R. (1996) Clinical pharmacokinetics and metabolism of chloroquine. Focus on recent advancements, *Clin Pharmacokinet* *31*, 257-274.
368. Mustfa, K., Landau, I., Chabaud, A.-G., Chavatte, J.-M., Chandenier, J., Duong, T. H., et Richard-Lenoble, D. (2011) Effects of the antimalarial drugs ferroquine and artesunate on *Plasmodium yoelii yoelii* gametocyteogenesis and vectorial transmission, *Sante* *21*, 133-142.
369. Natascha Chavain. (2008, septembre 29) Conception, synthèse, analyse structurale et activité antipaludique de dérivés de la ferroquine : investigation des mécanismes d'action, Université Lille 1 Nord de France, Villeneuve-d'Ascq, France.
370. Egan, T. J., Hunter, R., Kaschula, C. H., Marques, H. M., Miplon, A., et Walden, J. (2000) Structure-Function Relationships in Aminoquinolines: Effect of Amino and Chloro Groups on Quinoline-Hematin Complex Formation, Inhibition of β -Hematin Formation, and Antiplasmodial Activity, *Journal of Medicinal Chemistry* *43*, 283-291.
371. Gasser, G., Ott, I., et Metzler-Nolte, N. (2011) Organometallic Anticancer Compounds, *Journal of Medicinal Chemistry* *54*, 3-25.
372. Pigeon, P., Top, S., Vessieres, A., Huche, M., Hillard, E. A., Salomon, E., et Jaouen, G. (2005) Selective estrogen receptor modulators in the ruthenocene series. Synthesis and biological behavior, *J Med Chem* *48*, 2814-21.
373. Gale, R. J., et R., J. (1981) Metallocene electrochemistry. 3. Reduction-oxidation study of dicyclopentadienyl compounds of ruthenium and titanium in Lewis acid-base molten salts, *Inorganic Chemistry* *20*, 40-42.
374. Denisovich, L. I., Zakurin, N. V., Bezrukova, A. A., et Gubin, S. P. (1974) Chemical and electrochemical oxidation of metallocenes, reactions of metallocenes with mercury salts, *J. Organomet. Chem.* *81*, 207-216.
375. Gubin, S. P., Smirnova, S. A., Denisovich, L. I., et Lubovich, A. A. (1971) Redox properties of cyclopentadienylmetal compounds I. Ferrocene, ruthenocene, osmocene, *J. Organomet. Chem.* *30*, 243-255.
376. Kuwana, T., Bublitz, D. E., et Hoh, G. (1960) Chronopotentiometric Studies on the Oxidation of Ferrocene, Ruthenocene, Osmocene and Some of their Derivatives, *J. Am. Chem. Soc.* *82*, 5811-5817.

377. Watanabe, M., et Sano, H. (1991) ^1H -NMR Spectroscopic Studies on the Ruthenocene and Its Salts, *Chemistry letters* 20, 555-558.
378. Smith, T. P., Kwan, K. S., Taube, H., Bino, A., et Cohen, S. (1984) Reactivity of haloruthenocene(IV) complexes, *Inorganic chemistry* 23, 1943-1945.
379. Sohn, Y. S., Schlueter, A. W., Hendrickson, D. N., et Gray, H. B. (1974) Synthesis, characterization, and molecular structure of halogen oxidation products of ruthenocene, *Inorganic chemistry* 13, 301-304.
380. Stadlbauer, E. A., Nipper, E., et Wenzel, M. (1977) Synthesis of labeled metallocenes via double Π -ligand transfer, *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* 13, 491-508.
381. Müller, S. (2004) Redox and antioxidant systems of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*, *Mol. Microbiol.* 53, 1291-1305.
382. Ré, D. B., Nafia, I., Nieoullon, A., Le Goff, L. K., et Had-Aissouni, L. (2005) Stress oxydatif cérébral : les astrocytes sont-ils vulnérables aux faibles concentrations intracellulaires de glutamate ? Implications sur la survie neuronale, *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* 24, 502-509.
383. Chakravarty, S., et Rizvi, S. I. (2012) Circadian modulation of human erythrocyte plasma membrane redox system by melatonin, *Neuroscience Letters*. 518, 32-5.
384. Rahlfs, S., Schirmer, R. H., et Becker, K. (2002) The thioredoxin system of *Plasmodium falciparum* and other parasites, *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 1024-1041.
385. Atamna, H., et Ginsburg, H. (1993) Origin of reactive oxygen species in erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*, *Mol. Biochem. Parasitol* 61, 231-241.
386. Playfair, J. H., Dockrell, H., et Taverne, J. (1985) Macrophages as effector cells in immunity to malaria, *Immunol. Lett.* 11, 233-237.
387. Ribaut, C. (2008) Elaboration d'un biocapteur cellulaire impédancemétrique pour la mesure des changements physiologiques affectant la cellule parasitée, Université de Toulouse III - Paul Sabatier, Toulouse.
388. Kannan, R., Kumar, K., Sahal, D., Kukreti, S., et Chauhan, V. S. (2005) Reaction of artemisinin with haemoglobin: implications for antimalarial activity, *Biochem J* 385, 409-18.
389. Chavain, N., Vezin, H., Dive, D., Touati, N., Paul, J. F., Buisine, E., et Biot, C. (2008) Investigation of the redox behavior of ferroquine, a new antimalarial, *Mol Pharm* 5, 710-6.
390. Cherubini, A., Ruggiero, C., Polidori, M. C., et Mecocci, P. (2005) Potential markers of oxidative stress in stroke, *Free Radic Biol Med* 39, 841-52.
391. Park, J., Choi, K., Jeong, E., Kwon, D., Benveniste, E. N., et Choi, C. (2004) Reactive oxygen species mediate chloroquine-induced expression of chemokines by human astroglial cells, *Glia* 47, 9-20.

392. Scholtyseck, E., et Piekarski, G. (1965) [Electron microscopic studies on merozoites of Eimeria (*Eimeria perforans* and *E. stidae*) and *Toxoplasma gondii*. On the systematic position of *T. gondii*], *Z Parasitenkd* 26, 91-115.
393. Kilejian, A. (1991) Spherical bodies, *Parasitol. Today (Regul. Ed.)* 7, 309; author reply 309.
394. McFadden, G. I., et Waller, R. F. (1997) Plastids in parasites of humans, *BioEssays* 19, 1033-1040.
395. Gutteridge, W. E., Trigg, P. I., et Williamson, D. H. (1971) Properties of DNA from some malarial parasites, *Parasitology* 62, 209-219.
396. Chance, M. L., Warhurst, D. C., Baggaley, V. C., et Peters, W. (1972) Preparation and characterization of DNA from rodent malarial parasites, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 66, 3-4.
397. Kilejian, A. (1975) Circular mitochondrial DNA from the avian malarial parasite *Plasmodium lophurae*. *16*, 276-284.
398. Vaidya, A. B., et Arasu, P. (1987) Tandemly arranged gene clusters of malarial parasites that are highly conserved and transcribed, *Molecular and Biochemical Parasitology* 22, 249-257.
399. Creasey, A., Mendis, K., Carlton, J., Williamson, D., Wilson, I., et Carter, R. (1994) Maternal inheritance of extrachromosomal DNA in malaria parasites, *Mol. Biochem. Parasitol.* 65, 95-98.
400. Wilson, R. J., Fry, M., Gardner, M. J., Feagin, J. E., et Williamson, D. H. (1992) Subcellular fractionation of the two organelle DNAs of malaria parasites, *Curr. Genet.* 21, 405-408.
401. Gardner, M. J., Feagin, J. E., Moore, D. J., Spencer, D. F., Gray, M. W., Williamson, D. H., et Wilson, R. J. (1991) Organisation and expression of small subunit ribosomal RNA genes encoded by a 35-kilobase circular DNA in *Plasmodium falciparum*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 48, 77-88.
402. Wilson, R. J., Gardner, M. J., Feagin, J. E., et Williamson, D. H. (1991) Have malaria parasites three genomes?, *Parasitol. Today (Regul. Ed.)* 7, 134-136.
403. Wilson, R. J., Denny, P. W., Preiser, P. R., Rangachari, K., Roberts, K., Roy, A., Whyte, A., Strath, M., Moore, D. J., Moore, P. W., et Williamson, D. H. (1996) Complete gene map of the plastid-like DNA of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*, *J. Mol. Biol* 261, 155-172.
404. Wilson, R. J., et Williamson, D. H. (1997) Extrachromosomal DNA in the Apicomplexa, *Microbiol. Mol. Biol. Rev* 61, 1-16.
405. Fichera, M. E., et Roos, D. S. (1997) A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites, *Nature* 390, 407-409.
406. Egea, N., et Lang-Unnasch, N. (1996) Phylogeny of the large extrachromosomal DNA of organisms in the phylum Apicomplexa, *J. Eukaryot. Microbiol.* 43, 158.

407. Ralph, S. A., van Dooren, G. G., Waller, R. F., Crawford, M. J., Fraunholz, M. J., Foth, B. J., Tonkin, C. J., Roos, D. S., et McFadden, G. I. (2004) Tropical infectious diseases: metabolic maps and functions of the *Plasmodium falciparum* apicoplast, *Nat. Rev. Microbiol* 2, 203-216.
408. Cavalier-Smith, T. (2000) Membrane heredity and early chloroplast evolution, *Trends Plant Sci.* 5, 174-182.
409. Biot, C., Botté, C. Y., Dubar, F., et Maréchal, E. (2012) [Targeting malaria parasite at the level of apicoplast: an update], *Med Sci (Paris)* 28, 163-171.
410. Lim, L., et McFadden, G. I. (2010) The evolution, metabolism and functions of the apicoplast, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365, 749-63.
411. Keeling, P. J. (2008) Evolutionary biology: Bridge over troublesome plastids, *Nature* 451, 896-897.
412. Dahl, E. L., Shock, J. L., Shenai, B. R., Gut, J., DeRisi, J. L., et Rosenthal, P. J. (2006) Tetracyclines specifically target the apicoplast of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 3124-3131.
413. Dahl, E. L., et Rosenthal, P. J. (2007) Multiple antibiotics exert delayed effects against the *Plasmodium falciparum* apicoplast, *Antimicrob Agents Chemother* 51, 3485-90.
414. He, C. Y., Shaw, M. K., Pletcher, C. H., Striepen, B., Tilney, L. G., et Roos, D. S. (2001) A plastid segregation defect in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*, *EMBO J.* 20, 330-339.
415. Goodman, C. D., Su, V., et McFadden, G. I. (2007) The effects of anti-bacterials on the malaria parasite *Plasmodium falciparum*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 152, 181-191.
416. MacRae, J. I., Maréchal, E., Biot, C., et Botté, C. (2012) *Current Pharmaceutical Design* 18, in press.
417. Rohmer, M., Knani, M., Simonin, P., Sutter, B., et Sahm, H. (1993) Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate, *Biochem. J.* 295 (Pt 2), 517-524.
418. Jomaa, H., Wiesner, J., Sanderbrand, S., Altincicek, B., Weidemeyer, C., Hintz, M., Türbachova, I., Eberl, M., Zeidler, J., Lichtenthaler, H. K., Soldati, D., et Beck, E. (1999) Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs, *Science* 285, 1573-1576.
419. Ralph, S. A., van Dooren, G. G., Waller, R. F., Crawford, M. J., Fraunholz, M. J., Foth, B. J., Tonkin, C. J., Roos, D. S., et McFadden, G. I. (2004) Metabolic maps and functions of the *Plasmodium falciparum* apicoplast, *Nature Reviews Microbiology* 2, 203-216.
420. Fleige, T., Limenitakis, J., et Soldati-Favre, D. (2010) Apicoplast: keep it or leave it, *Microbes Infect* 12, 253-62.

421. Yeh, E., et DeRisi, J. L. (2011) Chemical rescue of malaria parasites lacking an apicoplast defines organelle function in blood-stage *Plasmodium falciparum*, *PLoS Biol.* 9, e1001138.
422. Eastman, R. T., Buckner, F. S., Yokoyama, K., Gelb, M. H., et Van Voorhis, W. C. (2006) Thematic review series: lipid posttranslational modifications. Fighting parasitic disease by blocking protein farnesylation, *J. Lipid Res.* 47, 233-240.
423. Moura, I. C., Wunderlich, G., Uhrig, M. L., Couto, A. S., Peres, V. J., Katzin, A. M., et Kimura, E. A. (2001) Limonene arrests parasite development and inhibits isoprenylation of proteins in *Plasmodium falciparum*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 2553-2558.
424. Templeton, T. J., Iyer, L. M., Anantharaman, V., Enomoto, S., Abrahante, J. E., Subramanian, G. M., Hoffman, S. L., Abrahamsen, M. S., et Aravind, L. (2004) Comparative analysis of apicomplexa and genomic diversity in eukaryotes, *Genome Res.* 14, 1686-1695.
425. Tarun, A. S., Vaughan, A. M., et Kappe, S. H. I. (2009) Redefining the role of de novo fatty acid synthesis in *Plasmodium* parasites, *Trends Parasitol.* 25, 545-550.
426. Cassera, M. B., Gozzo, F. C., D'Alexandri, F. L., Merino, E. F., del Portillo, H. A., Peres, V. J., Almeida, I. C., Eberlin, M. N., Wunderlich, G., Wiesner, J., Jomaa, H., Kimura, E. A., et Katzin, A. M. (2004) The methylerythritol phosphate pathway is functionally active in all intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*, *J. Biol. Chem* 279, 51749-51759.
427. Tonhosolo, R., D'Alexandri, F. L., Genta, F. A., Wunderlich, G., Gozzo, F. C., Eberlin, M. N., Peres, V. J., Kimura, E. A., et Katzin, A. M. (2005) Identification, molecular cloning and functional characterization of an octaprenyl pyrophosphate synthase in intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*, *Biochem. J.* 392, 117-126.
428. Tonhosolo, R., Gabriel, H. B., Matsumura, M. Y., Cabral, F. J., Yamamoto, M. M., D'Alexandri, F. L., Sussmann, R. A. C., Belmonte, R., Peres, V. J., Crick, D. C., Wunderlich, G., Kimura, E. A., et Katzin, A. M. (2010) Intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum* biosynthesize menaquinone, *FEBS Lett.* 584, 4761-4768.
429. Brooks, C. F., Johnsen, H., van Dooren, G. G., Muthalagi, M., Lin, S. S., Bohne, W., Fischer, K., et Striepen, B. (2010) The toxoplasma apicoplast phosphate translocator links cytosolic and apicoplast metabolism and is essential for parasite survival, *Cell Host Microbe* 7, 62-73.
430. Balabaskaran Nina, P., Morrissey, J. M., Ganesan, S. M., Ke, H., Pershing, A. M., Mather, M. W., et Vaidya, A. B. (2011) ATP synthase complex of *Plasmodium falciparum*: dimeric assembly in mitochondrial membranes and resistance to genetic disruption, *J. Biol. Chem.* 286, 41312-41322.
431. Morand, O. H., Aebi, J. D., Dehmlow, H., Ji, Y. H., Gains, N., Lengsfeld, H., et Hember, J. (1997) Ro 48-8.071, a new 2,3-oxidosqualene:lanosterol cyclase inhibitor lowering plasma cholesterol in hamsters, squirrel monkeys, and minipigs: comparison to simvastatin, *J. Lipid Res.* 38, 373-390.

432. Nagamune, K., Hicks, L. M., Fux, B., Brossier, F., Chini, E. N., et Sibley, L. D. (2008) Abscisic acid controls calcium-dependent egress and development in *Toxoplasma gondii*, *Nature* 451, 207-210.
433. Tonhosolo, R., D'Alexandri, F. L., de Rosso, V. V., Gazarini, M. L., Matsumura, M. Y., Peres, V. J., Merino, E. F., Carlton, J. M., Wunderlich, G., Mercadante, A. Z., Kimura, E. A., et Katzin, A. M. (2009) Carotenoid biosynthesis in intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*, *J. Biol. Chem.* 284, 9974-9985.
434. McLeod, R., Muench, S. P., Rafferty, J. B., Kyle, D. E., Mui, E. J., Kirisits, M. J., Mack, D. G., Roberts, C. W., Samuel, B. U., Lyons, R. E., Dorris, M., Milhous, W. K., et Rice, D. W. (2001) Triclosan inhibits the growth of *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii* by inhibition of apicomplexan Fab I, *Int. J. Parasitol.* 31, 109-113.
435. Surolia, N., et Surolia, A. (2001) Triclosan offers protection against blood stages of malaria by inhibiting enoyl-ACP reductase of *Plasmodium falciparum*, *Nat. Med* 7, 167-173.
436. Yu, M., Kumar, T. R. S., Nkrumah, L. J., Coppi, A., Retzlaff, S., Li, C. D., Kelly, B. J., Moura, P. A., Lakshmanan, V., Freundlich, J. S., Valderramos, J.-C., Vilcheze, C., Siedner, M., Tsai, J. H.-C., Falkard, B., Sidhu, A. B. S., Purcell, L. A., Gratraud, P., Kremer, L., Waters, A. P., Schiehser, G., Jacobus, D. P., Janse, C. J., Ager, A., Jacobs, W. R., Jr, Sacchettini, J. C., Heussler, V., Sinnis, P., et Fidock, D. A. (2008) The fatty acid biosynthesis enzyme FabI plays a key role in the development of liver-stage malarial parasites, *Cell Host Microbe* 4, 567-578.
437. Vial, H. J., et Ancelin, M. L. (1992) Malarial lipids. An overview, *Subcell. Biochem.* 18, 259-306.
438. Waller, R. F., Ralph, S. A., Reed, M. B., Su, V., Douglas, J. D., Minnikin, D. E., Cowman, A. F., Besra, G. S., et McFadden, G. I. (2003) A type II pathway for fatty acid biosynthesis presents drug targets in *Plasmodium falciparum*, *Antimicrob. Agents Chemother* 47, 297-301.
439. Ferguson, D. J. P., Campbell, S. A., Henriquez, F. L., Phan, L., Mui, E., Richards, T. A., Muench, S. P., Allary, M., Lu, J. Z., Prigge, S. T., Tomley, F., Shirley, M. W., Rice, D. W., McLeod, R., et Roberts, C. W. (2007) Enzymes of type II fatty acid synthesis and apicoplast differentiation and division in *Eimeria tenella*, *Int. J. Parasitol.* 37, 33-51.
440. Bisanz, C., Bastien, O., Grando, D., Jouhet, J., Maréchal, E., et Cesbron-Delauw, M.-F. (2006) *Toxoplasma gondii* acyl-lipid metabolism: de novo synthesis from apicoplast-generated fatty acids versus scavenging of host cell precursors, *Biochem. J.* 394, 197-205.
441. Zuther, E., Johnson, J. J., Haselkorn, R., McLeod, R., et Gornicki, P. (1999) Growth of *Toxoplasma gondii* is inhibited by aryloxyphenoxypropionate herbicides targeting acetyl-CoA carboxylase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 13387-13392.
442. Mazumdar, J., H Wilson, E., Masek, K., A Hunter, C., et Striepen, B. (2006) Apicoplast fatty acid synthesis is essential for organelle biogenesis and parasite survival in *Toxoplasma gondii*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 13192-13197.

443. Foth, B. J., Stimmler, L. M., Handman, E., Crabb, B. S., Hodder, A. N., et McFadden, G. I. (2005) The malaria parasite *Plasmodium falciparum* has only one pyruvate dehydrogenase complex, which is located in the apicoplast, *Mol. Microbiol.* 55, 39-53.
444. Joyard, Teyssier, Miege, Berny-Seigneurin, Marechal, Block, Dorne, Rolland, Ajlani, et Douce. (1998) The biochemical machinery of plastid envelope membranes, *Plant Physiol.* 118, 715-723.
445. Benning, C., et Ohta, H. (2005) Three enzyme systems for galactoglycerolipid biosynthesis are coordinately regulated in plants, *J. Biol. Chem.* 280, 2397-2400.
446. Santiago, T. C., Zufferey, R., Mehra, R. S., Coleman, R. A., et Mamoun, C. B. (2004) The *Plasmodium falciparum* PfGatp is an endoplasmic reticulum membrane protein important for the initial step of malarial glycerolipid synthesis, *J. Biol. Chem.* 279, 9222-9232.
447. Dubots, E., Botté, C., Boudière, L., Yamaro-Botté, Y., Jouhet, J., Maréchal, E., et Block, M. A. (2012) Role of phosphatidic acid in plant galactolipid synthesis, *Biochimie* 94, 86-93.
448. Crawford, M. J., Thomsen-Zieger, N., Ray, M., Schachtner, J., Roos, D. S., et Seeber, F. (2006) *Toxoplasma gondii* scavenges host-derived lipoic acid despite its de novo synthesis in the apicoplast, *EMBO J.* 25, 3214-3222.
449. Günther, S., Wallace, L., Patzewitz, E.-M., McMillan, P. J., Storm, J., Wrenger, C., Bissett, R., Smith, T. K., et Müller, S. (2007) Apicoplast lipoic acid protein ligase B is not essential for *Plasmodium falciparum*, *PLoS Pathog.* 3, e189.
450. Thomsen-Zieger, N., Schachtner, J., et Seeber, F. (2003) Apicomplexan parasites contain a single lipoic acid synthase located in the plastid, *FEBS Lett.* 547, 80-86.
451. Wrenger, C., et Müller, S. (2004) The human malaria parasite *Plasmodium falciparum* has distinct organelle-specific lipoylation pathways, *Mol. Microbiol.* 53, 103-113.
452. Cronan, J. E., Zhao, X., et Jiang, Y. (2005) Function, attachment and synthesis of lipoic acid in *Escherichia coli*, *Adv. Microb. Physiol.* 50, 103-146.
453. Günther, S., Storm, J., et Müller, S. (2009) *Plasmodium falciparum*: organelle-specific acquisition of lipoic acid, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 748-752.
454. Allary, M., Lu, J. Z., Zhu, L., et Prigge, S. T. (2007) Scavenging of the cofactor lipoate is essential for the survival of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*, *Mol. Microbiol.* 63, 1331-1344.
455. Bilaska, A., et Włodek, L. (2005) Lipoic acid - the drug of the future?, *Pharmacol Rep* 57, 570-577.
456. Bunik, V. I. (2003) 2-Oxo acid dehydrogenase complexes in redox regulation, *Eur. J. Biochem.* 270, 1036-1042.
457. Johnson, D. C., Dean, D. R., Smith, A. D., et Johnson, M. K. (2005) Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters, *Annu. Rev. Biochem.* 74, 247-281.

458. Fontecave, M., et Ollagnier-de-Choudens, S. (2008) Iron–sulfur cluster biosynthesis in bacteria: Mechanisms of cluster assembly and transfer, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 474, 226-237.
459. Ellis, K. E., Clough, B., Saldanha, J. W., et Wilson, R. J. (2001) Nifs and Sufs in malaria, *Mol. Microbiol.* 41, 973-981.
460. Gardner, M. J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R. W., Carlton, J. M., Pain, A., Nelson, K. E., Bowman, S., Paulsen, I. T., James, K., Eisen, J. A., Rutherford, K., Salzberg, S. L., Craig, A., Kyes, S., Chan, M.-S., Nene, V., Shallom, S. J., Suh, B., Peterson, J., Angiuoli, S., Pertea, M., Allen, J., Selengut, J., Haft, D., Mather, M. W., Vaidya, A. B., Martin, D. M. A., Fairlamb, A. H., Fraunholz, M. J., Roos, D. S., Ralph, S. A., McFadden, G. I., Cummings, L. M., Subramanian, G. M., Mungall, C., Venter, J. C., Carucci, D. J., Hoffman, S. L., Newbold, C., Davis, R. W., Fraser, C. M., et Barrell, B. (2002) Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*, *Nature* 419, 498-511.
461. (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*, *Nature* 408, 796-815.
462. Seeber, F. (2002) Biogenesis of iron-sulphur clusters in amitochondriate and apicomplexan protists, *Int. J. Parasitol.* 32, 1207-1217.
463. Kumar, B., Chaubey, S., Shah, P., Tanveer, A., Charan, M., Siddiqi, M. I., et Habib, S. (2011) Interaction between sulphur mobilisation proteins SufB and SufC: Evidence for an iron–sulphur cluster biogenesis pathway in the apicoplast of *Plasmodium falciparum*, *International Journal for Parasitology* 41, 991-999.
464. Surolia, N., et Padmanaban, G. (1992) biosynthesis of heme offers a new chemotherapeutic target in the human malarial parasite, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 187, 744-750.
465. van Dooren, G. G., Stimmler, L. M., et McFadden, G. I. (2006) Metabolic maps and functions of the *Plasmodium* mitochondrion, *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 596-630.
466. van Dooren, G. G., Marti, M., Tonkin, C. J., Stimmler, L. M., Cowman, A. F., et McFadden, G. I. (2005) Development of the endoplasmic reticulum, mitochondrion and apicoplast during the asexual life cycle of *Plasmodium falciparum*, *Mol. Microbiol.* 57, 405-419.
467. Wilson, R. J. M. I. (2005) Parasite plastids: approaching the endgame, *Biol Rev Camb Philos Soc* 80, 129-153.
468. Seow, F., Sato, S., Janssen, C. S., Riehle, M. O., Mukhopadhyay, A., Phillips, R. S., Wilson, R. J. M. I., et Barrett, M. P. (2005) The plastidic DNA replication enzyme complex of *Plasmodium falciparum*, *Mol. Biochem. Parasitol* 141, 145-153.
469. Lindner, S. E., Llinás, M., Keck, J. L., et Kappe, S. H. I. (2011) The primase domain of PfPrex is a proteolytically matured, essential enzyme of the apicoplast, *Mol. Biochem. Parasitol.* 180, 69-75.

470. McFadden, G. I., et Roos, D. S. (1999) Apicomplexan plastids as drug targets, *Trends Microbiol.* 7, 328-333.
471. Champoux, J. J. (2001) DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism, *Annu. Rev. Biochem.* 70, 369-413.
472. Pennisi, E. (1999) INFECTIOUS DISEASES: Malarial Genome Comes Into View, *Science* 286, 1263a-1265.
473. Raghu Ram, E. V., Kumar, A., Biswas, S., Chaubey, S., Siddiqi, M. I., et Habib, S. (2007) Nuclear gyrB encodes a functional subunit of the Plasmodium falciparum gyrase that is involved in apicoplast DNA replication, *Mol Biochem Parasitol* 154, 30-9.
474. Kampranis, S. C., Gormley, N. A., Tranter, R., Orphanides, G., et Maxwell, A. (1999) Probing the binding of coumarins and cyclothialidines to DNA gyrase, *Biochemistry* 38, 1967-1976.
475. Khor, V., Yowell, C., Dame, J. B., et Rowe, T. C. (2005) Expression and characterization of the ATP-binding domain of a malarial Plasmodium vivax gene homologous to the B-subunit of the bacterial topoisomerase DNA gyrase, *Mol. Biochem. Parasitol.* 140, 107-117.
476. Gardner, M. J., Williamson, D. H., et Wilson, R. J. (1991) A circular DNA in malaria parasites encodes an RNA polymerase like that of prokaryotes and chloroplasts, *Mol. Biochem. Parasitol.* 44, 115-123.
477. McConkey, G. A., Rogers, M. J., et McCutchan, T. F. (1997) Inhibition of Plasmodium falciparum protein synthesis. Targeting the plastid-like organelle with thiostrepton, *J. Biol. Chem.* 272, 2046-2049.
478. Yeo, A. E., Rieckmann, K. H., et Christopherson, R. I. (1998) Indirect inhibition by antibiotics of nucleotide and deoxynucleotide biosynthesis in Plasmodium falciparum, *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 29, 24-26.
479. Briolant, S., Almeras, L., Belghazi, M., Boucomont-Chapeaublanc, E., Wurtz, N., Fontaine, A., Granjeaud, S., Fusai, T., Rogier, C., et Pradines, B. (2010) Plasmodium falciparum proteome changes in response to doxycycline treatment, *Malar J* 9, 141.
480. Goodman, C. D., Su, V., et McFadden, G. I. (2007) The effects of anti-bacterials on the malaria parasite Plasmodium falciparum, *Mol. Biochem. Parasitol.* 152, 181-191.
481. Zhang, L., Ging, N. C., Komoda, T., Hanada, T., Suzuki, T., et Watanabe, K. (2005) Antibiotic susceptibility of mammalian mitochondrial translation, *FEBS Lett.* 579, 6423-6427.
482. Dahl, E. L., et Rosenthal, P. J. (2008) Apicoplast translation, transcription and genome replication: targets for antimalarial antibiotics, *Trends Parasitol* 24, 279-84.
483. Howe, C. J., et Purton, S. (2007) The little genome of apicomplexan plastids: its raison d'être and a possible explanation for the « delayed death » phenomenon, *Protist* 158, 121-133.

484. Auerbach, T., Bashan, A., Harms, J., Schluenzen, F., Zarivach, R., Bartels, H., Agmon, I., Kessler, M., Pioletti, M., Franceschi, F., et Yonath, A. (2002) Antibiotics targeting ribosomes: crystallographic studies, *Curr Drug Targets Infect Disord* 2, 169-186.
485. Jackson, K. E., Habib, S., Frugier, M., Hoen, R., Khan, S., Pham, J. S., Ribas de Pouplana, L., Royo, M., Santos, M. A. S., Sharma, A., et Ralph, S. A. (2011) Protein translation in Plasmodium parasites, *Trends Parasitol.* 27, 467-476.
486. Camps, M., Arrizabalaga, G., et Boothroyd, J. (2002) An rRNA mutation identifies the apicoplast as the target for clindamycin in Toxoplasma gondii, *Mol. Microbiol.* 43, 1309-1318.
487. Borrmann, S., Adegnik, A. A., Moussavou, F., Oyakhirome, S., Esser, G., Matsiegui, P.-B., Ramharter, M., Lundgren, I., Kombila, M., Issifou, S., Hutchinson, D., Wiesner, J., Jomaa, H., et Kremsner, P. G. (2005) Short-course regimens of artesunate-fosmidomycin in treatment of uncomplicated Plasmodium falciparum malaria, *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 3749-3754.
488. Sidhu, A. B. S., Sun, Q., Nkrumah, L. J., Dunne, M. W., Sacchettini, J. C., et Fidock, D. A. (2007) In vitro efficacy, resistance selection, and structural modeling studies implicate the malarial parasite apicoplast as the target of azithromycin, *J. Biol. Chem.* 282, 2494-2504.
489. Clough, B., Strath, M., Preiser, P., Denny, P., et Wilson, I. R. (1997) Thiostrepton binds to malarial plastid rRNA, *FEBS Lett.* 406, 123-125.
490. Rogers, M. J., Bukhman, Y. V., McCutchan, T. F., et Draper, D. E. (1997) Interaction of thiostrepton with an RNA fragment derived from the plastid-encoded ribosomal RNA of the malaria parasite, *RNA* 3, 815-820.
491. Ekland, E. H., Schneider, J., et Fidock, D. A. (2011) Identifying apicoplast-targeting antimalarials using high-throughput compatible approaches, *FASEB J.* 25, 3583-3593.
492. Böttger, E. C. (2007) Antimicrobial agents targeting the ribosome: the issue of selectivity and toxicity - lessons to be learned, *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 791-795.
493. Pradel, G., et Schlitzer, M. (2010) Antibiotics in malaria therapy and their effect on the parasite apicoplast, *Curr Mol Med* 10, 335-49.
494. Kiatfuengfoo, R., Suthiphongchai, T., Prapunwattana, P., et Yuthavong, Y. (1989) Mitochondria as the site of action of tetracycline on Plasmodium falciparum, *Mol. Biochem. Parasitol.* 34, 109-115.
495. Fleige, T., et Soldati-Favre, D. (2008) Targeting the transcriptional and translational machinery of the endosymbiotic organelle in apicomplexans, *Curr Drug Targets* 9, 948-56.
496. Andriole, V. T. (2006) The quinolones. In *The Quinolones*, p 477-490, Academic Press; 3 edition (September 25, 2000).

497. Le, T. P., Yeaman, M. R., et Bayer, A. S. (2003) Treatment of Experimental and Human Bacterial Endocarditis with Quinolone Antimicrobial Agents. In *Quinolone Antimicrobial Agents*, p 259-274, Hooper, D. C. Rubinstein, E., Washington.
498. Greenwood, D. (1978) Activity of flumequine against *Escherichia coli*: in vitro comparison with nalidixic and oxolinic acids, *Antimicrob. Agents Chemother.* 13, 479-483.
499. Stromberg, A., et Bjorkman, A. (1992) Ciprofloxacin does not achieve radical cure of *Plasmodium falciparum* infection in Sierra Leone, *Trans R Soc Trop Med Hyg* 86, 373.
500. Divo, A. A., Sartorelli, A. C., Patton, C. L., et Bia, F. J. (1988) Activity of fluoroquinolone antibiotics against *Plasmodium falciparum* in vitro, *Antimicrob Agents Chemother* 32, 1182-6.
501. Drlica, K., et Malik, M. (2003) Fluoroquinolones: action and resistance, *curr top Med Chem* 3, 249-82.
502. Hooper, D. C. (2001) Mechanisms of action of antimicrobials: focus on fluoroquinolones, *Clin Infect Dis* 32 Suppl 1, S9-S15.
503. Dubar, F., Anquetin, G., Pradines, B., Dive, D., Khalife, J., et Biot, C. (2009) Enhancement of the antimalarial activity of ciprofloxacin using a double prodrug/bioorganometallic approach, *J Med Chem* 52, 7954-7.

CHAPITRE II

COMPREHENSION DU MECANISME D'ACTION DE LA FERROQUINE

I. Introduction

Les essais cliniques effectués avec la FQ ont permis de montrer que ce candidat médicament est bien toléré et présente une bonne activité sur tous types de souches ou isolats de *P. falciparum*. Les études antérieures avaient permis de mettre en lumière, la complexité du mécanisme d'action de cette molécule. Dans ces travaux, nous avons conçu et synthétisé des analogues de la FQ pour tenter d'améliorer nos connaissances sur les mécanismes permettant son activité. Ainsi, les propriétés physicochimiques de la FQ ont été étudiées, particulièrement ses propriétés rédox. D'autre part, nous avons étudié la localisation et les mécanismes d'inhibition de la croissance du pigment malarique.

II. Mécanisme d'action

II.1. Propriétés physico-chimiques de la FQ et de ses analogues

II.1.1. Préambule

Durant les premières études sur la compréhension du mécanisme d'action de la FQ, la contribution possible des propriétés rédox de l'atome de fer présent dans la FQ et de la présence d'une liaison hydrogène intramoléculaire sur l'activité antipaludique avait été évoquée(1-3).

Pour tenter de répondre à ces hypothèses, nous avons conçu et synthétisé de nouveaux analogues de la FQ.

Les propriétés rédox du ruthénocène sont différentes de celle du ferrocène. Dans le cas des dérivés ruthénium de l'hydroxytamoxifène, aucune activité antiproliférative n'a été observée.(4) Ceci a été supposé dû à l'absence de production de ROS en présence de ce type de molécules. La substitution de l'atome de fer par un atome de ruthénium a donc été réalisée afin d'évaluer l'importance des propriétés rédox du fer mais en conservant la présence du métallocène dans la chaîne latérale de la molécule.

L'introduction de différents substituants sur l'azote en position 11 de la FQ a permis d'évaluer l'influence de la lipophilie des molécules sur l'activité antipaludique.(2) Aucune corrélation entre l'évolution de la lipophilie et l'activité antipaludique n'avait pu être établie. C'est pourquoi, il avait été suggéré que la diminution d'activité de cette série de molécules pourrait être due à une autre propriété de la molécule. Nous avons suggéré que la FQ pourrait posséder une conformation repliée dans laquelle existerait une liaison hydrogène

intramoléculaire. La substitution de l'azote en position 11 devrait empêcher la formation de cette liaison et ainsi nous permettre d'étudier l'influence de l'absence de cette liaison sur l'activité antipaludique. Nous avons choisi de substituer l'azote 11 par un groupement méthyle afin de limiter l'apport de lipophilie. La molécule a été nommée ferroquine méthylée (FQ-Me).

L'analogue suivant, la ruthénoquine méthylée (RQ-Me) possède les deux modifications, c'est-à-dire le remplacement de l'atome de fer par un atome de ruthénium et la substitution de l'azote 11 par un groupement méthyle. Cette molécule ne devrait pas former de liaison hydrogène intramoléculaire et ne devrait pas être capable de produire des espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les conditions oxydantes de la vacuole digestive.

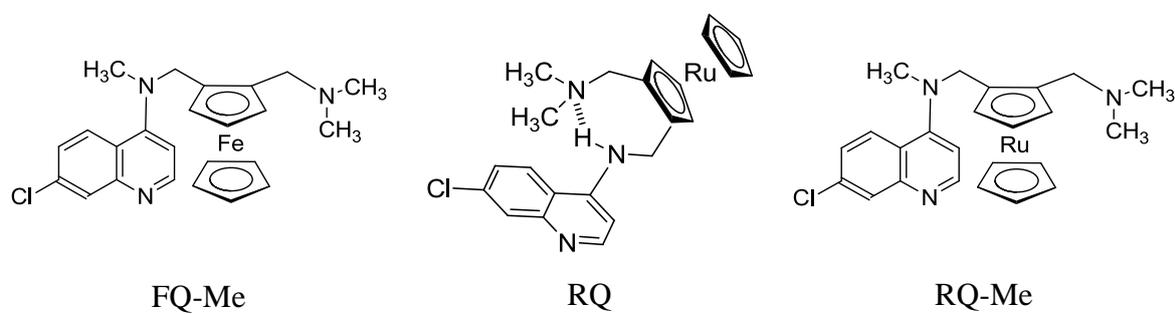


Figure 44 : Structures chimiques de la FQ-Me, de la RQ et de la RQ-Me

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'étude des propriétés physicochimiques qui nous semblaient importantes pour l'activité antipaludique : (i) l'influence de la structure sur la lipophilie, les constantes d'acidité et les degrés d'ionisation de ces analogues ; (ii) liaison hydrogène intramoléculaire ; (iii) leur capacité à générer des radicaux hydroxyles (HO^\bullet) *in vitro* dans les conditions oxydantes de la vacuole digestive. La perméabilité de ces analogues pourra être prédite grâce à la détermination des pourcentages d'ionisation des formes diprotonées, monoprotionées et neutres.

II.1.2. Constantes de dissociation acide et lipophilie

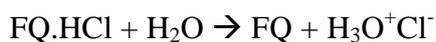
Nous avons étudié l'influence des modifications structurales sur la lipophilie/hydrophobicité des analogues. Les coefficients de distribution ($\log D$) ont été déterminés par une méthode HPLC au pH cytosolique (7,4) et au pH vacuolaire (5,2) en collaboration avec le Dr. Forfar au laboratoire de pharmacochimie de l'Université Victor Segalen de Bordeaux 2 (EA 4138).

Composés	$\log D_{5,2}$	$\log D_{7,4}$	pK_{a1}	pK_{a2}
CQ	-1,20	0,85	10,03	7,94
FQ	-0,77	2,95	8,45	7,00
FQ-Me	-0,56	3,04	8,80	7,05
RQ	-0,73	3,35	7,97	6,99
RQ-Me	-0,04	3,60	9,20	7,18

Tableau 7 : Coefficients de distribution ($\log D$) et constantes de dissociation acide (pK_a) de la CQ, FQ, FQ-Me, RQ et de la RQ-Me.

Les pourcentages d'ionisation des formes diprotonées, monoprotonées et neutres des analogues ont été déterminés grâce à l'équation de Henderson-Hasselbach à partir des valeurs de pK_a obtenus par potentiométrie.

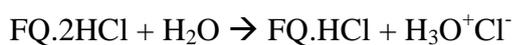
Les calculs sont détaillés ci-dessous avec la FQ pour exemple :



$$K_{a1} = ([FQ] * [H_3O^+]) / [FQ.HCl]$$

$$pK_{a1} = pH - \log ([FQ] / [FQ.HCl])$$

et



$$K_{a2} = ([FQ.HCl] * [H_3O^+]) / [FQ.2HCl]$$

$$pK_{a2} = pH - \log ([FQ.HCl] / [FQ.2HCl])$$

$$pK_{a1} + pK_{a2} = 2pH - \log ([FQ] / [FQ.2HCl]) = 2pH + \log[FQ] - \log[FQ.2HCl]$$

$$\log([FQ] / [FQ.2HCl]) = 2pH - pK_{a1} - pK_{a2} \rightarrow ([FQ] / [FQ.2HCl]) = 10^{(2pH - pK_{a1} - pK_{a2})}$$

$$\log([FQ] / [FQ.HCl]) = pH - pK_{a1} \rightarrow ([FQ] / [FQ.HCl]) = 10^{(pH - pK_{a1})}$$

pH = 5,2 ou 7,4

pK_{a1} = 8,45

pK_{a2} = 7,00

% forme diprotonée = $([FQ.2HCl] / ([FQ] + [FQ.HCl] + [FQ.2HCl])) * 100$

% forme diprotonée = $100 * (1 / (1 + ([FQ.HCl]/[FQ.2HCl]) + ([FQ]/[FQ.2HCl])))$

% forme diprotonée = $100 / (1 + (10^{(2pH - pK_{a1} - pK_{a2}))} + (10^{(pH - pK_{a1}))})$

et

% forme monoprotée = $([FQ.HCl] / ([FQ] + [FQ.HCl] + [FQ.2HCl])) * 100$

% forme monoprotée = $((([FQ.2HCl] / ([FQ] + [FQ.HCl] + [FQ.2HCl])) * ([FQ.HCl]/[FQ.2HCl]))) * 100$

% forme monoprotée = % forme diprotonée * $10^{(pH - pK_{a1})}$

et

% forme neutre = $([FQ] / ([FQ] + [FQ.HCl] + [FQ.2HCl]))$

% forme neutre = 100 - % forme monoprotée - % forme diprotonée

Composés	% de formes présentes à pH 5,2			% de formes présentes à pH 7,4		
	2+ (charge)	1+	0	2+	1+	0
CQ	100,00	0,00	0,00	99,70	0,23	0,07
FQ	99 ;94	0,06	0,00	76,16	6,79	17,05
FQ-Me	99,97	0,03	0,00	88,58	3,53	7,89
RQ	99,83	0,17	0,00	50,99	13,73	35,28
RQ-Me	99,99	0,01	0,00	95,96	1,52	2,52

Tableau 8 : Pourcentages d'ionisation de la FQ, la FQ-Me, la RQ, la RQ-Me et la CQ à pH 5,2 et à pH 7,4.

Tous les composés sont fortement hydrophiles au pH vacuolaire (5,2) et sont majoritairement sous leur forme diprotonée. A ce pH, la lipophilie de ces analogues peut être classée comme suit RQ-Me > FQ-Me > RQ > FQ > CQ. Au pH vacuolaire, les différences entre les coefficients de distribution sont faibles. De plus, le remplacement de l'atome de fer de la FQ par un atome de ruthénium dans la RQ n'a pas d'influence sur la lipophilie des molécules.

Au pH cytosolique (7,4), en dehors de la CQ, tous les composés sont significativement lipophiles. Le classement de lipophilie suit cet ordre : RQ-Me > RQ > FQ-Me > FQ. Contrairement à ce qui a été observé au pH vacuolaire, le remplacement de l'atome de fer dans la FQ et la FQ-Me par un atome de ruthénium dans la RQ et dans la RQ-Me, engendre une augmentation de la lipophilie d'un facteur 3. Cette augmentation peut se justifier par le fait que l'atome de ruthénium (électronégativité selon Pauling : EN = 2,2) est plus électronégatif que le fer (EN = 1,8). De ce fait, les liaisons Ru-C ($\Delta EN = 0,35$) du ruthénocène sont moins polarisées que celles Fe-C ($\Delta EN = 0,75$) du ferrocène. D'autre part, le volume (plus important) de l'atome de ruthénium par rapport à celui de l'atome de fer pourrait également justifier cette élévation d'hydrophobicité.

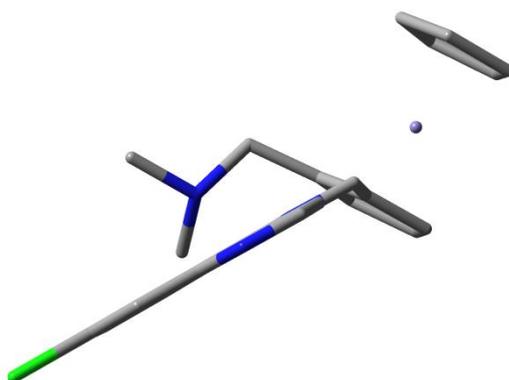
De plus, à ce pH (7,4), les degrés d'ionisation doivent être pris en considération car les deux composés méthylés FQ-Me et RQ-Me sont majoritairement diprotonés alors que FQ et RQ présentent des pourcentages non négligeables de leurs formes neutres et monoprotées. La présence du groupement méthyle donneur sur l'azote 11 engendre l'augmentation de la valeur de pK_{a1} (la constante de dissociation acide du groupe amine de la chaîne latérale) de ces deux composés.

II.1.3. Liaison hydrogène intramoléculaire

Le caractère lipophile de la FQ et de ses analogues est l'une des hypothèses avancées pour tenter d'expliquer leur haute activité antipaludique par rapport à celle de la CQ. La formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire pourrait également participer à l'activité de la FQ par l'adoption d'une conformation particulière. Pour tenter de répondre à cette hypothèse, nous avons donc étudié la conformation de la FQ, de la RQ, de la FQ-Me et de la RQ-Me par calculs DFT en utilisant la fonctionnelle B3LYP et le set de base TZVP. La fonctionnelle B3LYP est une fonctionnelle hybride, c'est-à-dire qu'elle possède une partie d'échange basée sur la méthode de Hartree-Fock (HF) dépendante des orbitales alors que la

partie de corrélation est basée sur une autre approche (soit issue de méthodes *ab-initio*, soit (semi-)empirique). Le set de base TZVP repose sur un modèle *ab-initio* et correspond à une base comportant trois fonctions de base par orbitale atomique de valence. En effet, comme les différentes orbitales ont des développements spatiaux différents, la combinaison permet d'ajuster le développement spatiale de la densité électronique de manière appropriée à l'environnement du système chimique étudié. Nous avons choisi de travailler par calculs DFT car ils permettent d'obtenir rapidement et à moindre coût, des résultats d'une grande précision, proches de ce qui pourrait être obtenu par calculs post-Hartree-Fock.

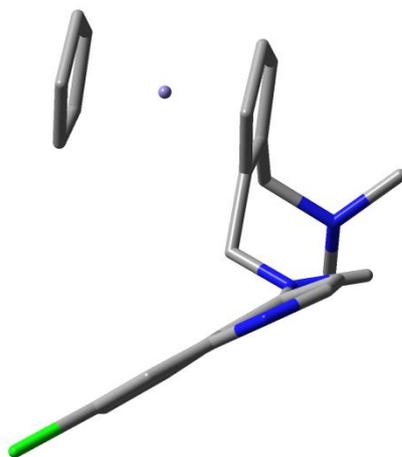
Dans le vide, les conformations d'énergie minimale pour la FQ neutre et la RQ neutre sont similaires et mettent en évidence la présence d'une liaison hydrogène intramoléculaire entre l'hydrogène porté par l'azote 11 (H11) et l'azote 24 (N24) (*Figure 45*). La liaison d'hydrogène intramoléculaire est légèrement plus forte dans la FQ que dans la RQ, la différence d'énergie étant de 1,4 kcal / mol.



FQ

Figure 45 : Conformation de plus basse énergie de la FQ (ou RQ) obtenue après minimisation (les atomes d'hydrogènes ne sont pas représentés)(5)

La présence des groupes méthyles dans la FQ-Me et la RQ-Me engendre une modification de l'orientation de la chaîne latérale portant l'amine par rapport au noyau quinoléine (*Figure 46*).



FQ-Me

Figure 46 : Conformation de plus basse énergie de la FQ-Me (ou RQ-Me) obtenue après minimisation (les atomes d'hydrogènes ne sont pas représentés)(5)

Par rapport à la FQ (et la RQ), le groupement métallocénique encombrant est orienté de manière à minimiser les interactions stériques et électroniques avec le noyau quinoléine.

Les surfaces des potentiels électrostatiques moléculaires (PEM) ont été estimées (*Figure 47*) pour les deux molécules par calcul du PEM des surfaces des composés. Le code de couleurs utilisé est conventionnel : les potentiels électrostatiques négatifs sont présentés en rouge, et les potentiels électrostatiques positifs sont présentés en bleu. Le vert indique des surfaces où les potentiels sont proches de zéro.

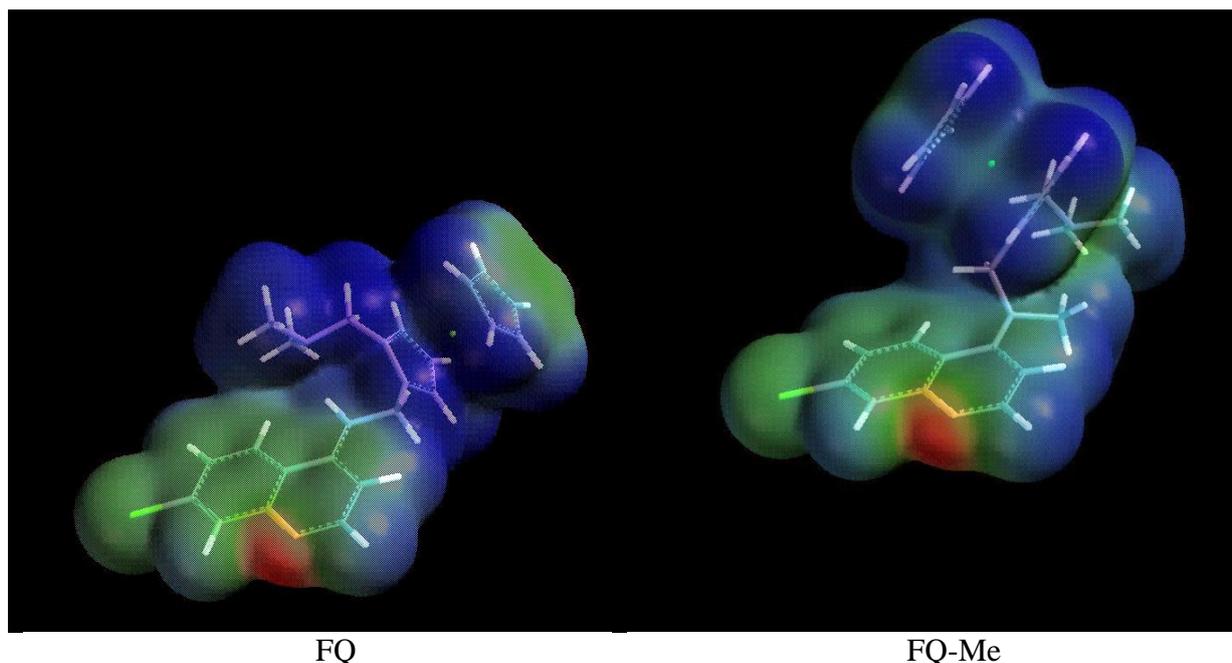


Figure 47 : Surfaces des potentiels électrostatiques moléculaires de la FQ et de la FQ-Me(5)

Le potentiel négatif est localisé sur la position occupée par l'azote du noyau quinoléine. La zone entre les méthyles et les cycles cyclopentadiényles présente le potentiel le plus positif. Les aires de surfaces polaires (PSA) ont été évaluées à 14 \AA^2 pour FQ et à 10 \AA^2 pour FQ-Me. Ces analyses suggèrent que la FQ et la RQ sont susceptibles de présenter une liaison hydrogène intramoléculaire (dans les milieux possédant une constante diélectrique faible) alors que la FQ-Me et la RQ-Me n'en sont pas capables.

Les prédictions de cette étude ont été vérifiées expérimentalement par résonance magnétique nucléaire (RMN) en solution. Après avoir fait une attribution complète des signaux RMN ^1H , ^{13}C et ^{15}N . Les interactions non covalentes ont été étudiées par deux types d'expériences : NOESY (= Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy) et HMBC (= Heteronuclear Multiple Bond Correlation).

L'expérience NOESY est une expérience 2D homonucléaire. Elle permet de visualiser l'interaction dipolaire entre protons (nuclear overhauser effect, NOE). Un signal NOE est observé si la distance entre les protons est inférieure à 5 \AA . L'expérience NOESY corrèle tous les protons qui sont proches l'un de l'autre. On peut alors observer une corrélation entre des protons qui sont distants d'un point de vue scalaire mais proches dans l'espace. L'expérience HMBC est une expérience 2D hétéronucléaire. Les signaux observés sur un spectre HMBC

représentent des couplages scalaires à travers 2, 3 ou 4 liaisons. Chaque signal correspond à la corrélation entre un ^1H et un hétéroatome (ici l'azote ^{15}N) séparés par 2, 3 ou 4 liaisons.

Pour la RQ sous forme neutre, les déplacements chimiques de N24 et H11 sont corrélés avec ceux obtenus lors des expériences RMN ^{15}N -HMBC, démontrant ainsi la présence d'une liaison hydrogène intramoléculaire en solution à faible constante diélectrique (CDCl_3 , $\epsilon = 4,81$). En outre, des expériences NOESY ont permis de confirmer que la RQ neutre adopte une conformation repliée. En effet, cette conformation particulière a été validée par la présence de NOE entre H5 et les groupes méthyles terminaux, entre H3 et H12, et par l'absence de NOE entre H5 et H12, et entre H3 et H11.

Des expériences NOESY ont également été menées dans d_5 -pyridine à faible concentration et à température plus élevée (343 K) à 400 MHz. Dans ces conditions expérimentales, aucune différence dans les spectres NOESY n'a pu être observée, confirmant ainsi que les NOEs observés précédemment étaient bien intramoléculaires et non intermoléculaires. Des observations similaires avaient été faites sur la FQ. Cependant, en milieu aqueux (D_2O), des expériences ROESY ont montré que la FQ diprotonée ne présente pas cette conformation repliée et ne possède pas de conformation fixe. En effet, seuls des ROEs entre H3 et H12 et entre H5 et H12 ont été observés.

D'autre part, il est attendu que la FQ-Me et la RQ-Me ne sont pas capables d'établir une liaison hydrogène intramoléculaire. Après attribution complète des spectres RMN ^1H et ^{13}C en solution de la FQ-Me et de la RQ-Me, des expériences COSY, ^{13}C -HSQC, ^{13}C -HMBC, et NOESY ont été réalisées en solution. Les résultats obtenus sont identiques pour la FQ-Me et pour la RQ-Me, c'est pourquoi je ne détaillerai que les résultats obtenus avec la FQ-Me. En solution dans le CDCl_3 , des NOEs ont été observés entre H5 et H27, entre H3 et H27, entre H12 et H5, et entre H12 et H3. Ces résultats montrent clairement que la liaison C4-N11 n'est pas bloquée (contrairement aux observations faites avec la FQ et la RQ).

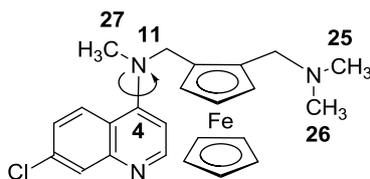


Figure 48 : Numérotation sélective de la FQ-Me

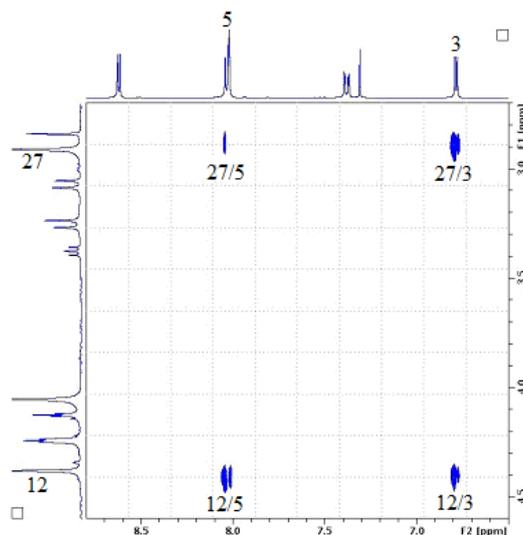


Figure 49 : Spectre NOESY de la FQ-Me

Les déplacements chimiques des atomes d'azote ont été déterminés indirectement grâce à des expériences de ^{15}N -HMBC, qui permettent de compenser la faible sensibilité et l'abondance naturelle de ce noyau. Les cinq composés étudiés CQ, FQ, RQ, FQ-Me et RQ-Me peuvent être séparés en deux groupes. La liaison hydrogène est observée dans le premier (CQ, FQ, et RQ) et est absente dans le second (FQ-Me et RQ-Me). Ces deux groupes présentent des déplacements chimiques différents. La présence de la liaison hydrogène conduit à un effet de blindage sur $^{15}\text{N}1$ (16 ppm) et un effet de déblindage sur $^{15}\text{N}11$ (environ 15 ppm) et sur ^{15}N de la chaîne latérale (environ 5 ppm). Ces expériences de RMN confirment les résultats de l'étude de calculs conformationnels, ce qui démontre que la FQ et la RQ présentent bien une liaison hydrogène intramoléculaire dans des solvants non aqueux.

La combinaison des calculs théoriques et des expériences de RMN nous ont permis de démontrer clairement que la liaison hydrogène intramoléculaire formée entre H11 et N24 de la FQ (ou RQ) n'est pas présente dans l'eau lorsqu'elle est sous sa forme diprotonée. Pour la FQ et la RQ, il existe une conformation « fermée », formée par la mise en place d'un système cyclique temporaire, où les groupements polaires sont masqués par le solvant. Pour la FQ-Me et la RQ-Me, il existe seulement des conformations « ouvertes » où les groupements polaires sont exposés au solvant.

Au pH cytosolique (7,4) nous avons montré que la FQ et la RQ se trouvent sous leur forme neutre, monoprotinée et diprotonée alors que la CQ se trouve principalement sous sa forme diprotonée.

Récemment, l'étude de la littérature a permis de mettre en évidence le fait que la présence de liaisons hydrogènes intramoléculaires est essentielle dans le développement de nouvelles molécules à visée thérapeutique.⁶ En effet, des études de RMN ont permis de montrer que lorsqu'une molécule est dans une conformation faisant intervenir une liaison hydrogène intramoléculaire, alors le nombre de rotation possible est diminué, ce qui permet de réduire l'entropie et de stabiliser cette conformation. D'autre part, cette conformation serait potentiellement moins polaire et donc plus soluble dans les lipides, en raison du fait que les atomes donneurs d'hydrogène et les atomes accepteurs de liaison hydrogène ne seraient plus disponibles pour interagir avec les molécules d'eau.

Des résultats similaires ont été rapportés dans des travaux récents. En effet, un comportement analogue a été rapporté pour des agonistes des récepteurs NK1(6) et pour des peptides cycliques(7). Toutefois, il est important de noter que ces exemples impliquent tous des cycles à six chaînons alors que nos molécules impliquent des cycles à sept chaînons. La FQ et la RQ représenteraient donc une nouvelle classe. De plus, contrairement aux cycles à six chaînons qui sont plans(8), les cycles contenus dans la FQ et dans la RQ ne le sont pas.

Nous supposons donc que les formes « fermées » de la FQ et de la RQ devraient donc posséder une meilleure perméabilité membranaire que les formes « ouvertes » de la FQ-Me et de la RQ-Me. D'autre part, la liaison hydrogène intramoléculaire présente dans ces molécules possède une énergie relativement faible, ce qui permet la balance entre les formes neutres de la FQ (ou de la RQ) et les formes diprotonées de la FQ • 2HCl (ou la RQ • 2HCl).(3)

Au pH cytosolique, la molécule est donc sous sa forme « fermée » et peut donc traverser aisément la membrane de la vacuole digestive. Dès son accumulation dans le compartiment acide, la molécule se trouve dans sa forme « ouverte » diprotonée et n'est plus capable de traverser de nouveau la membrane, réduisant ainsi l'efflux.

II.1.4. Propriétés rédox

II.1.4.1. Génération de radicaux hydroxyles

Sous des conditions oxydantes proches de celles de la vacuole digestive, il a été montré que la FQ est capable d'engendrer la production de radicaux hydroxyles par réaction de type Fenton.

Nous avons émis l'hypothèse que la substitution de l'azote N11 par un groupement méthyle ne devrait pas affecter la capacité de la molécule à produire des radicaux hydroxyles en conditions oxydantes. En revanche, dans les conditions oxydantes de la vacuole digestive(9, 10), les molécules dont l'atome de fer a été remplacé par un atome de ruthénium ne devraient pas être capables d'engendrer la production de radicaux HO°. Pour vérifier ces hypothèses, des expériences de piégeage de spin (ou spin trapping) par résonance paramagnétique électronique (RPE) ont été réalisées sur la RQ, la RQ-Me et la FQ-Me (toutes à 1mM).

L'agent de piégeage utilisé pour suivre la production de radicaux HO° est le 5,5-diméthyl-1-pyrroline *N*-oxyde (DMPO). Les conditions d'oxydation ont été induites par addition d'une solution d'H₂O₂ (30%) afin d'obtenir des concentrations finales à 1 et 15 mM. La concentration d'H₂O₂ vacuolaire correspondrait à 15 mM.(10) D'autre part, le pH de la vacuole digestive du parasite étant acide (5,2), seul les espèces diprotonées ont été testées lors de ces analyses.

Parmi les trois espèces testées, seule la FQ-Me affiche un spectre quadruplet d'intensité 1:2:2:1 avec des constantes de couplages hyperfines, $a_H = a_N = 13,2$ G (Figure 50). Ce type de profil est caractéristique du piégeage de radicaux hydroxyles par le DMPO.

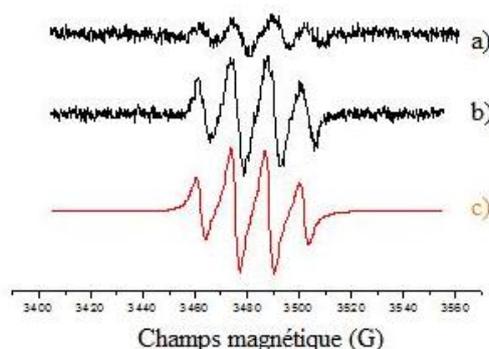


Figure 50 : Spectres RPE de piégeage de radicaux à température ambiante dans l'eau (a) FQ-Me • 2HCl (1mM), H₂O₂ (1mM) (b) FQ-Me • 2HCl (1mM), H₂O₂ (15mM), (c) simulation de (b) avec $a_H = a_N = 13,2$ G.

Ces résultats spectroscopiques mettent en évidence la formation du produit d'addition de l'agent de piégeage avec les radicaux hydroxyles, DMPO-OH°. L'absence de signal dans les spectres réalisés avec la RQ et la RQ-Me, montre que les dérivés ruthénocènes ne sont pas

capables de générer la formation de radicaux HO° dans les conditions oxydantes proches de celles de la vacuole digestive.

Les radicaux HO° formés par la FQ-Me diprotonée au cours de la réaction de type Fenton ont été quantifiés par double intégration de spectres RPE, c'est-à-dire en intégrant deux fois le spectre RPE différentiel mesuré sur l'intervalle entier. Le 2,2,6,6-tétraméthylpipéridinyl-1-oxyle (TEMPO) a été utilisé comme référence d'intensité à une concentration de 0,1 mM dans le méthanol. La quantité de radicaux HO° a été estimée à 0,6 et 3,5 pM pour la FQ-Me·2HCl, en présence de 1 et 15 mM de H₂O₂, respectivement. Ces résultats sont conformes à ceux obtenus précédemment pour FQ·2HCl.⁽¹⁾ L'introduction d'un groupement méthyle sur l'atome N11 n'a donc pas d'influence sur la capacité de la molécule à engendrer la production de radicaux HO° via des réactions de type Fenton.

II.1.4.2. Comportements électrochimiques

II.1.4.2.1. FQ-Me

Précédemment le comportement électrochimique de la FQ a été reporté pour ses formes neutre et diprotonée.⁽¹⁾ Il avait été montré par voltamétrie cyclique que la FQ peut subir une oxydation réversible à un électron et ainsi conduire au ferriquinium.

L'oxydation de la FQ-Me en « méthylferriquinium » a été étudiée par voltamétrie cyclique au laboratoire de Chimie Organique et Macromoléculaire (Université Lille 1). Les mesures électrochimiques ont été faites en comparaison avec celles obtenues pour la FQ.

Les mesures de potentiels (ΔE_p) et de potentiels de demi-vague $E_{1/2}$ des composés ont été réalisées dans l'acétonitrile (*Tableau 9*).

Composé	$E_{1/2}$, mV	ΔE_p , mV
FQ	461,5	63
FQ-Me	431,0	62

Tableau 9 : Potentiels de demi-vague $E_{1/2}$ et différences de potentiel d'électrode ΔE_p des composés (1 mM, 100mV/s).

La différence entre les potentiels d'oxydation et de réduction souligne la réversibilité à un électron de la réaction. Comme pour la FQ, la valeur (relativement) élevée du potentiel de demi-vague $E_{1/2}$ reflète une certaine résistance à la perte d'électrons (*Figure 51*).

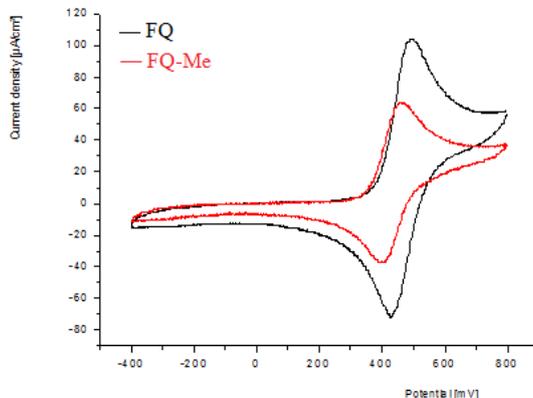


Figure 51 : Voltammogrammes de la FQ et de la FQ-Me

La FQ-Me présente donc la même capacité que la FQ à subir une réaction d'oxydation réversible à un électron et peut ainsi former le méthylferriquinium.

II.1.4.2.2. RQ et RQ-Me

Pour des raisons de solubilité, l'étude électrochimique de la RQ et de la RQ-Me a été réalisée dans du dichlorométhane. Cependant, lors des expériences de voltamétrie cyclique, nous avons été confronté à des problèmes d'électroprécipitation. De ce fait, des calculs DFT ont été utilisés pour tenter de comprendre le comportement électrochimique de la RQ sous formes neutre et diprotoné. Les énergies des différents états d'oxydation ont été calculées en utilisant la fonctionnelle B3LYP(11, 12) et le set de base TZVP(13). Les résultats ont montré que la RQ diprotonée présente une plus grande résistance à la perte d'électrons que la FQ diprotonée ($\Delta E_{1/2} = E_{1/2}(\text{RQ}) - E_{1/2}(\text{FQ}) = 0,92 \text{ V}$). Les mécanismes d'oxydation auront donc lieu à des potentiels plus élevés pour la RQ et donc la probabilité pour que la RQ perde un électron est plus faible.

II.1.4.5. Conclusion sur les propriétés rédox

La différence majeure entre la FQ, la FQ-Me, la RQ et la RQ-Me est l'incapacité des complexes Ru (II) à générer des radicaux hydroxyles dans les conditions oxydantes de la vacuole digestive. Il convient donc de noter que les propriétés d'oxydo-réduction du ferrocène

et du ruthénocène diffèrent totalement.(4, 14) Le ferrocène est connu pour subir facilement une oxydation à un électron pour donner du Fe (III) alors qu'il a été suggéré que le ruthénocène subit une oxydation à deux électrons pour donner du Ru (IV).(15) Bien qu'il ait été démontré que le Ru (III) peut être formé, la vulnérabilité de ce complexe envers les attaques nucléophiles engendre rapidement la formation de Ru (IV).(15) Les calculs DFT réalisés durant ce travail, montrent que la RQ diprotonée présente une plus grande résistance à la perte d'électrons ($\Delta E_{1/2} = 0,92$ V) que la FQ diprotonée. Ces différences de propriétés rédox peuvent expliquer l'absence de formation de radicaux hydroxyles par la RQ et la RQ-Me.

III.1. Activités antipaludiques, résistances et cytotoxicité

III.1.1. Activités antipaludiques

Les activités antipaludiques de la FQ, la FQ-Me, la RQ et la RQ-Me ont été comparées avec celles de la CQ, la méfloquine (MQ) et la dihydroartémisinine (DHA). La détermination de ces valeurs a été réalisée par le Dr Bruno Pradines (Unité de parasitologie - IRBA Antenne de Marseille).

La FQ et la RQ présentent des valeurs de CI_{50} similaires. En fait, la RQ possède une activité légèrement inférieure à celle de la FQ mais qui reste supérieure à la CQ et la MQ. La RQ est environ 1,4 fois moins active que la FQ. Cette différence pourrait être imputée à l'absence de production de radicaux hydroxyles dans le cas de la RQ.

Composés	$CI_{50} \pm EC$ (nM)					
	3D7	D6	8425	Bres	W2	K14
FQ	$3,8 \pm 0,9$	$5,2 \pm 0,6$	$6,5 \pm 0,6$	$2,3 \pm 2,0$	$6,4 \pm 1,0$	$12,8 \pm 2,0$
FQ-Me	$99,8 \pm 20,3$	$81,9 \pm 10,5$	$52,8 \pm 4,7$	$201,4 \pm 15,0$	$200,9 \pm 5,3$	$200,0 \pm 9,1$
RQ	$5,5 \pm 1,4$	$6,3 \pm 1,3$	$7,4 \pm 1,0$	$4,1 \pm 1,5$	$8,2 \pm 1,8$	$16,3 \pm 3,4$
RQ-Me	$16,9 \pm 3,0$	$15,8 \pm 4,0$	$37,5 \pm 13,2$	$20,2 \pm 8,9$	$30,8 \pm 5,5$	$63,7 \pm 8,7$
CQ	$21,3 \pm 6,3$	$23,0 \pm 4,9$	$25,5 \pm 7,1$	$442,6 \pm 87,0$	$485,3 \pm 76,0$	$648,6 \pm 131$

Tableau 10 : Sensibilités *in vitro* de 3 clones CQ-sensibles et 3 clones CQ-résistants aux analogues de la FQ. Moyennes sur 5 expériences indépendantes.

La FQ-Me a une activité au moins 15 fois inférieure à celle de la FQ sur tous les clones de *P. falciparum*. Cependant, la FQ-Me conserve une activité supérieure à la CQ sur les clones CQ-résistants.

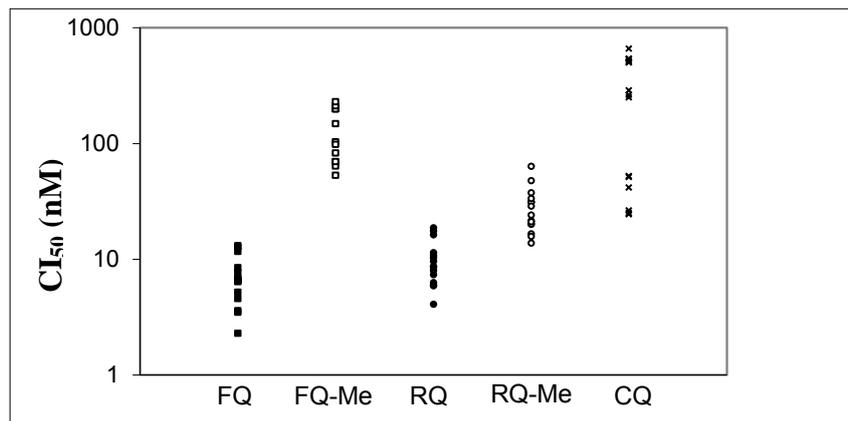


Figure 52 : Activités antipaludique *in vitro* de la CQ, FQ, RQ, FQ-Me et RQ-Me sur quinze clones CQ-sensibles et CQ-résistants.

La CQ, la FQ, la FQ-Me, la RQ, et la RQ-Me ont été testées *in vitro* sur quinze souches de *P. falciparum*. Les moyennes géométriques des valeurs de CI₅₀ et l'intervalle de confiance à 95% sont 6,4 nM (4,09-8,04) pour FQ, 126,4 nM (94-170) pour FQ-Me, 9,2 nM (7,2-11,6) pour RQ, 26,1 nM (20,6- 33,0) pour RQ-Me, et 157 nM (76-325) pour CQ. La différence de réponse entre la FQ et la RQ est significative (p -value = 0,0007). D'autre part, toutes les différences, entre les réponses des cinq composés, sont significatives ($0,0007 < p$ -value $< 0,0468$).

La FQ et la RQ sont plus actives *in vitro* que la CQ, même lorsqu'il s'agit de souches CQ-sensibles. Cette différence pourrait provenir d'une amélioration du transport membranaire engendrée par leur caractère lipophile, mais aussi par la présence d'une liaison hydrogène intramoléculaire plus stable que dans le cas de la CQ.

III.1.2. Résistances

II.1.2.1. Résistances croisées

La résistance croisée est définie comme étant la résistance du parasite à un médicament, auquel il n'a pas été exposé mais qui résulte d'une résistance acquise envers un autre médicament. L'évaluation de la résistance croisée entre différents composés peut être estimée grâce au coefficient de corrélation (r) et au coefficient de détermination (r^2) calculés grâce aux valeurs de CI₅₀ des deux molécules. Les résistances croisées *in vitro* ont été déterminées grâce à la corrélation des valeurs de CI₅₀ pour les 15 souches de *P. falciparum*, en comparant les molécules par paire (l'une en fonction de l'autre) (Tableau 11).

		FQ	FQ-Me	RQ	RQ-Me	CQ
FQ	r	1				
	p-value					
FQ-Me	r	-0.0353	1			
	p-value	0.9007				
RQ	r	0.9586	0.0859	1		
	p-value	0.0001	0.7608			
RQ-Me	r	0.6126	0.3352	0.5848	1	
	p-value	0.0152	0.222	0.022		
CQ	r	0.1077	0.8006	0.2	0.4747	1
	p-value	0.7024	0.0003	0.4749	0.0738	

Tableau 11 : Corrélation des réponses *in vitro* obtenues d'après les valeurs des CI_{50} de la CQ, FQ, RQ, FQ-Me et RQ-Me testés sur 15 souches de *P. falciparum*.

Une corrélation positive significative a été trouvée entre les valeurs de CI_{50} de la FQ et la RQ, entre la FQ et la RQ-Me, entre la FQ-Me et la CQ, et entre la RQ et la RQ-Me. Une corrélation positive entre les valeurs de CI_{50} de deux médicaments antipaludiques peut suggérer soit le risque d'apparition d'une résistance croisée soit l'existence de mécanismes d'action communs. Pour pouvoir suggérer des mécanismes d'action ou de résistance similaires pour deux composés, le coefficient de détermination doit être élevé, comme celui déterminé entre la FQ et la RQ ($r^2 = 0,96$).

III.1.2.2. Gènes impliqués dans la résistance de *P. falciparum*

Plusieurs mutations du génome de *P. falciparum* ont été décrites comme prépondérantes dans les problèmes de résistances rencontrés avec les thérapies quinoléiques antipaludiques. En collaboration avec le Dr Christophe Rogier, nous avons étudié les corrélations entre les CI_{50} des différentes molécules étudiées avec le polymorphisme des gènes suivants : *pfcr1* (*P. falciparum* chloroquine resistance transporter) codant pour Pfcr1(16), *pfmdr1* (*P. falciparum* multidrug resistance 1) codant pour pfmdr1 ou Pgh1,(17, 18) *pfmdr2* (*P. falciparum* multidrug resistance 2) codant pour Pfmdr2,(19) PfMRP (*P. falciparum* multidrug resistance-associated protein) codant pour PfMRP1,(20) et *pfhne-1* (*P. falciparum* Na^+/H^+ exchanger) codant pour PfNHE.(21)

Génotype	FQ	FQ-Me	RQ	RQ-Me	CQ
Mutation dans le codon 74 de <i>pfprt</i>	0,7234	0,0047	0,5557	0,1949	0,0015
Mutation dans le codon 75 de <i>pfprt</i>	0,7234	0,0047	0,5557	0,1949	0,0015
Mutation dans le codon 76 de <i>pfprt</i>	0,7234	0,0047	0,5557	0,1949	0,0015
Mutation dans le codon 220 de <i>pfprt</i>	0,7234	0,0047	0,5557	0,1949	0,0015
Mutation dans le codon 271 de <i>pfprt</i>	0,8884	0,1904	0,5719	0,6942	0,0145
Mutation dans le codon 326 de <i>pfprt</i>	1,0000	0,0372	0,8170	0,2472	0,0012
Mutation dans le codon 256 de <i>pfprt</i>	0,2786	0,1939	0,1939	0,0833	0,0141
Mutation dans le codon 371 de <i>pfprt</i>	0,7234	0,0047	0,5557	0,1949	0,0015
Mutation dans le codon 86 de <i>pfmdr1</i>	0,6022	0,0372	0,6434	0,8170	0,0641
Mutation dans le codon 184 de <i>pfmdr1</i>	0,0362	0,5637	0,0209	0,1939	0,3123
Mutation dans le codon 1034 de <i>pfmdr1</i>	0,2023	0,3082	0,1264	0,1264	0,0617
Mutation dans le codon 1042 de <i>pfmdr1</i>	0,2023	0,3082	0,1264	0,1264	0,0617
Mutation dans le codon 1246 de <i>pfmdr1</i>	0,1645	0,6434	0,2472	0,1052	0,1052
Nombre de copie de <i>pfmdr1</i> (1, 2 et 3)	0,9213	0,0718	0,8752	0,4783	0,0313
Mutation dans le codon 208 de <i>pfmdr2</i>	0,3913	0,0356	0,3918	0,1857	0,0734
Mutation dans le codon 423 de <i>pfmdr2</i>	0,3913	0,0356	0,3918	0,1857	0,0734
Mutation dans le codon 191 de <i>pfmrp</i>	0,7234	0,0047	0,5557	0,1949	0,0015
Mutation dans le codon 437 de <i>pfmrp</i>	0,7234	0,0047	0,5557	0,1949	0,0015
<i>pfnhe-1</i> profile ms4760	0,2861	0,1111	0,2935	0,2057	0,0399
<i>pfnhe-1</i> profile ms4760 (2, 3, 6 et 7)	0,3042	0,0226	0,2128	0,0868	0,0081
<i>pfnhe-1</i> nombre de répétition de DNNND (1, 2, 3 et 4)	0,1640	0,0311	0,1236	0,1651	0,0131
<i>pfnhe-1</i> nombre de répétition deDDNHNDNHNN	0,2382	0,0251	0,1573	0,3458	0,0451

Tableau 12 : Corrélations entre les CI₅₀ de la FQ, de la FQ-Me, de la RQ, de la RQ-Me et de la CQ avec le polymorphisme de *pfprt*, *pfmdr1*, *PfMRP* et *pfnhe-1*.

Après analyse statistique, les valeurs déterminées lors de cette étude sont comprises entre 1 et 0,0012. La valeur « 1 » représente la probabilité de ne pas obtenir de résultat significatif. La probabilité d'obtenir un résultat significatif a été définie pour les valeurs inférieures à 0,0024. D'après les résultats obtenus, nous n'avons pas trouvé d'association significative entre la CI₅₀ de la FQ et le polymorphisme des gènes *pfprt*, *pfmdr1*, *pfmdr2*, *PfMRP*, *pfnhe-1* ou le nombre de copies du gène *pfmdr1* (Tableau 12). En revanche, des associations significatives ont été trouvées entre la CI₅₀ de la CQ et le polymorphisme des gènes *pfprt* et *PfMRP*. La moyenne géométrique obtenue pour la CQ est de 37 ± 13 nM pour les gènes de type sauvage 76 *Pfprt* ou de type sauvage *PfMRP* et de 451 ± 146 nM pour les

gènes mutants 76 *pfcr1* et mutant *PfMRP*. Les associations entre la CI_{50} de la CQ et le profil ms4760, le nombre de répétitions de DNNND ou DDDNHNDNHNN, et le nombre de copies du gène *pfmdr1* ne sont pas significatives. D'autre part, aucune association significative n'a été trouvée entre la CI_{50} de la RQ ou de la RQ-Me et les polymorphismes des gènes *pfcr1*, *pfmdr1*, *pfmdr2*, *PfMRP*, *pfmhe-1* ou le nombre de copies du gène *pfmdr1*. Des associations significatives ont été trouvées entre la CI_{50} de la FQ-Me et le polymorphisme des gènes *pfcr1*, *PfMRP*, *pfmdr1*, *pfmdr2*, le nombre de répétitions de DNNND ou DDDNHNDNHNN et le nombre de copies du gène *pfmdr1* avant les corrections statistiques mais pas après.

La forte activité de la FQ (et de la RQ) sur des souches ou des isolats CQ-, QN-, monodeséthyl-AQ-, ou MQ-résistantes de *P. falciparum* et l'absence de résistance croisée, suggèrent que ces deux molécules possèdent des modes d'action et / ou des mécanismes de résistance différents. Ces mécanismes semblent donc différents de ceux impliqués dans la résistance à la CQ, à la QN, et à la MQ, car aucune corrélation n'a été observée avec les polymorphismes des gènes *pfcr1*, *PfMRP*, *pfmdr1*, ou *pfmhe-1*. L'absence de relation entre l'activité de la FQ et les polymorphismes du gène *pfcr1* est conforme aux résultats précédents. La présence du noyau ferrocénique dans la FQ semble modifier considérablement le comportement pharmacologique de la FQ par rapport à celui de la CQ. L'activité antipaludique de la FQ chez *P. falciparum*, serait donc indépendante de la résistance à la CQ.

Ces données suggèrent que la FQ-Me et la CQ possèderaient le même mécanisme de résistance et qu'elles seraient probablement expulsées par les mêmes protéines de transport. Ces processus pourraient donc jouer un rôle important dans le mécanisme d'action moléculaire de la FQ.

III.2. Cytotoxicité

La cytotoxicité des composés a été évaluée en utilisant des cellules de fibroblastes de souris 3T6 et a été réalisée en collaboration avec le Dr Delphine Forge (Université de Mons-Hainaut, Belgique).(22)

Molécules	CI ₅₀ (nM)
FQ	1,06 ± 0,01
FQ-Me	8,58 ± 0,07
RQ	1,49 ± 0,08
RQ-Me	11,55 ± 0,06

Tableau 13 : Cytotoxicité de la FQ, FQ-Me, RQ et RQ-Me sur des fibroblastes de souris 3T6.

Tous les composés présentent une cytotoxicité relativement faible envers des cellules adhérentes 3T6 (Tableau 13), toutefois les dérivés méthylés sont moins cytotoxiques et présentent des valeurs du même ordre de grandeur. La FQ présente la plus forte cytotoxicité alors que la RQ-Me est la molécule la moins cytotoxique.

Le calcul de l'index thérapeutique permet d'évaluer le rapport effet thérapeutique/risque de nos molécules, de ce fait plus la valeur est faible et plus le médicament devra être utilisé avec précautions. Les meilleures molécules seront donc celles qui présentent un index thérapeutique haut. Le calcul de cet index a été réalisé comme suit : (CI₅₀ (3D7) / CI₅₀ (3T6)). Il faut noter qu'en raison de la faible activité antipaludique de la FQ-Me, ce composé présente le plus faible index thérapeutique. Les valeurs obtenues sont de 83,3 pour la FQ-Me, 248 pour la RQ, 303 pour la FQ, et 696 pour la RQ-Me. La RQ-Me présente donc le meilleur index thérapeutique suivi de la FQ, de la RQ et de la FQ-Me.

III.3. Localisation et imagerie

Les données présentées dans ce travail de thèse, en plus des études antérieures réalisées par le groupe du Pr Biot,(23) montrent clairement que l'effet hydrophobe de la FQ et de la RQ n'est pas suffisant pour expliquer leur haute activité antipaludique. La conformation particulière de la FQ et de la RQ engendrée par la présence d'une liaison hydrogène intramoléculaire, ainsi que l'équilibre existant entre leurs formes neutre, monoproté, et diproté devraient leur permettre de traverser les membranes plus efficacement que la CQ. Même si la production de radicaux HO° engendrée par la FQ dans la vacuole digestive ne semble pas être la contribution clé dans l'activité antipaludique *in vitro*, cette contribution pourrait avoir un intérêt majeur dans les études *in vivo*. D'autre part, l'effet hydrophobe de la chaîne latérale ne semble pas jouer un rôle prépondérant dans les mécanismes de résistance.

La FQ et la RQ sont actives contre les souches CQ-sensibles et CQ-résistantes de *P. falciparum*. Les CI₅₀ (déterminées sur différentes souches) de la FQ sont corrélées avec celles

de la RQ mais ne le sont pas avec les CI_{50} de la CQ. De plus, les activités antipaludiques de la FQ et de la RQ ne semblent pas être corrélées à des mutations impliquées dans la résistance aux médicaments quinoléiques. Ainsi, malgré des différences dans leurs propriétés physico-chimiques, notamment dans leurs propriétés rédox, la FQ et la RQ possèdent des activités antipaludiques *in vitro* similaires. Néanmoins, il faut noter que la RQ ne devrait pas être développée comme thérapeutique car le coût supplémentaire engendré par la présence du ruthénocène pourrait être un frein important pour les industriels. Toutefois, la RQ pourrait être un analogue très utile pour étudier la distribution cellulaire et la bioconcentration de la FQ dans les cellules. D'autre part, la méthylation de l'atome N11 de la FQ et de la RQ engendre une baisse sensible de l'activité biologique et produit l'apparition d'un risque de résistance croisée entre la FQ-Me et la CQ. Ces résultats fournissent de nouveaux indices importants sur le mode d'action de la FQ et nous permettent de proposer l'utilisation de nouvelles sondes pour l'étude de son mécanisme d'action.

III.3.1. Accumulation cellulaire

III.3.1.1. Accumulation cellulaire de la RQ, données expérimentales

La présence d'un groupement ferrocénique dans la structure de la FQ serait l'une des clés expliquant la haute activité de cette molécule. D'autre part, l'atome de fer présent dans cette molécule empêche la détection directe de la FQ dans l'hématie parasitée. En effet, dans les érythrocytes infectés par *P. falciparum*, de nombreuses espèces contiennent des atomes de fer, le fer est le principale constituant des globules rouges, mais il est également présent dans l'hème, dans l'hématine et dans l'hémozoïne. L'utilisation d'une sonde s'est donc avérée nécessaire pour étudier l'accumulation cellulaire de la FQ. Comme vu précédemment, de nombreuses études ont été initiées pour tenter de comparer les phénomènes d'accumulation de la CQ dans son site d'action entre les souches CQ-sensibles et CQ-résistantes. Malheureusement, l'absence de protocoles expérimentaux standardisés engendre une variété considérable de données différentes, dépendantes de la souche utilisée, du temps d'incubation, de la concentration externe de médicament utilisée... D'autre part, la plupart de ces études sont réalisées grâce à des modifications lourdes de la molécule à étudier : radiomarquage, fixation d'une partie fluorescente... Durant ces travaux, nous avons choisi de travailler à une dose cliniquement pertinente de 40 nM (CI_{90} de la CQ), quelle que soit la molécule étudiée afin d'avoir une homogénéité dans les différentes expériences menées. De plus, nous avons

choisi d'utiliser la RQ comme traceur froid de la FQ ; la RQ-Me comme témoin de l'importance du pont hydrogène intramoléculaire pour l'activité antipaludique.

L'absorption cellulaire de la RQ (quantification des atomes de Ru) dans les globules rouges infectés par une souche CQ-sensible (HB3) de *P. falciparum* a été étudiée par ICP-MS (Inductively coupled plasma mass spectrometry, *Annexe*) en collaboration avec Jean-Charles Morin (Institut Pasteur de Lille Santé, Développement Durable Nord, Lille). Les analyses ont été réalisées à la dose de 40 nM avec des temps d'incubation de 5 min, 10 min et 15 min. (*Partie expérimentale*).

Les résultats brutes obtenus sont les suivants :

Temps (min)	Echantillons	Ru (nmol/éch)	Echantillons	Ru (nmol/éch)
5	HB3 traités-RQ (culot)	0,0484	HB3 traités-RQ (surnageant)	0,0678
10	HB3 traités-RQ (culot)	0,0487	HB3 traités-RQ (surnageant)	0,0660
15	HB3 traités-RQ (culot)	0,0479	HB3 traités-RQ (surnageant)	0,0614
5	Sains et traités-RQ (culot)	0,0255	Sains et traités-RQ (surnageant)	0,0785
10	Sains et traités-RQ (culot)	0,0257	Sains et traités-RQ (surnageant)	0,0763
15	Sains et traités-RQ (culot)	0,0223	Sains et traités-RQ (surnageant)	0,0731
5	HB3 traités-RQ-Me (culot)	0,0338	HB3 traités-RQ-Me (surnageant)	0,0888
10	HB3 traités-RQ-Me (culot)	0,0459	HB3 traités-RQ-Me (surnageant)	0,0806
15	HB3 traités-RQ-Me (culot)	0,0494	HB3 traités-RQ-Me (surnageant)	0,0795
5	Sains et traités-RQ-Me (culot)	0,0262	Sains et traités-RQ-Me (surnageant)	0,0660
10	Sains et traités-RQ-Me (culot)	0,0204	Sains et traités-RQ-Me (surnageant)	0,0726
15	Sains et traités-RQ-Me (culot)	0,0266	Sains et traités-RQ-Me (surnageant)	0,0704

Tableau 14 : Quantification du Ru par ICP-MS dans des globules rouges traités par la RQ (ou la RQ-Me) et dans des globules rouges parasités par une souche CQ-sensible (HB3) de *P. falciparum* et traités par la RQ (ou la RQ-Me).

D'après ces résultats, nous avons déterminé le ratio d'accumulation de la RQ (ou de la RQ-Me) dans les hématies parasitées par rapport aux hématies saines et par rapport au milieu de culture. Les calculs effectués sont détaillés dans la partie expérimentale.

Tout d'abord, il est important de noter qu'après centrifugation des échantillons de culture parasitée par la souche HB3 et traitée par la RQ, le culot est composé de quatre types d'érythrocytes différents (*Figure 53*) : les globules rouges sains (GRS), les globules rouges parasités (GRP), les globules sains contenant de la RQ (GRS-Ru) et les globules rouges parasités contenant de la RQ (GRP-Ru).

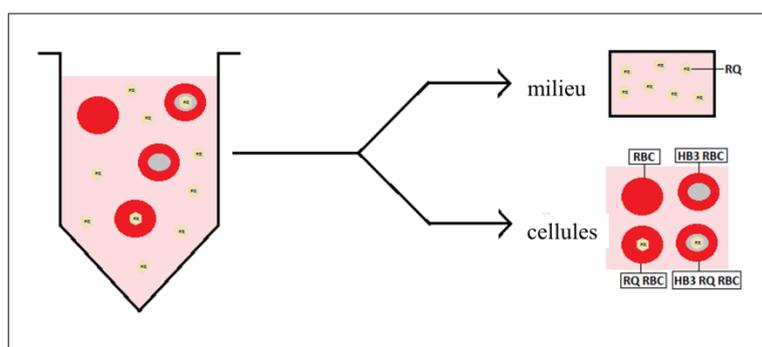


Figure 53 : Représentation schématique de la composition des échantillons de cultures parasitées par HB3 et traitées par la RQ, analysés par ICP-MS.

Composés	temps	%drogue	%drogue	ratio
		accumulé dans 1 μ L de GRP	accumulé dans 1 μ L de GRS	
RQ	5	10,9881	0,6286	17
	10	11,0668	0,6460	17
	15	13,0742	0,5998	22
RQ-Me	5	0	0,7277	0
	10	9,2131	0,5620	16
	15	6,9982	0,7028	10

Tableau 15 : Comparaison de l'accumulation cellulaire entre les globules rouges parasités et les globules rouges sains.

Les données indiquent que la RQ s'accumule préférentiellement dans les hématies parasitées par rapport aux hématies saines avec un ratio de 17 : 1 (GRP : GR) et par rapport au milieu de culture avec un ratio de 184 : 1 (GRP : milieu de culture), après 5 min de temps d'incubation. Ces remarques sont applicables aux autres temps d'incubations. Les ratios d'accumulation sont identiques à 5 et 10 min et augmentent légèrement à 15 min, ce qui montre que l'accumulation de la RQ dans les hématies parasitées atteint très vite un équilibre.

D'autre part, la présence de la liaison hydrogène intramoléculaire dans la chaîne latérale influence non seulement la cinétique d'accumulation, mais aussi le rapport d'accumulation des biosondes dans les globules rouges infectés. En effet, si l'on considère que la RQ et la RQ-Me montrent une plus haute sélectivité *in vitro* envers les hématies infectées par rapport aux globules rouges sains et par rapport au milieu de culture, il faut noter que la RQ présente une cinétique plus rapide et que l'équilibre est plus rapidement atteint. En effet, la RQ-Me n'a pas pu être détectée dans les hématies parasitées après 5 min de temps d'incubation. Néanmoins, il est important de contraster ces résultats, en effet les données ne montrent pas une absence de RQ-Me. Les limites de détection au niveau pg/L ne sont pas suffisantes pour détecter les éventuelles molécules de RQ-Me présentes. Dans tous les cas, après 15 min d'incubation, la RQ s'accumule plus que la RQ-Me dans les érythrocytes infectés par rapport aux hématies saines avec des ratios d'accumulation de 22 (RQ) et 10 (RQ-Me) et par rapport au milieu de culture avec des ratios d'accumulation de 215 (RQ) et 122 (RQ-Me). Ces données suggèrent que l'accumulation de la RQ et de la RQ-Me est dépendante du temps et nous ont permis de démontrer la plus grande affinité de nos composés pour les hématies parasitées. Cette étude suggère que la FQ s'accumulerait également préférentiellement dans les hématies parasitées, permettant ainsi une spécificité. D'autre part, il avait été montré que la CQ s'accumule environ 22 fois plus dans les hématies parasitées par rapport aux hématies saines²⁷, cependant, ces expériences avaient été réalisées à une concentration de CQ élevée de 1,2 μM et un temps de contact de 24h. Ces données montrent que la CQ s'accumule nettement moins rapidement et moins efficacement que la RQ (donc que la FQ) dans les hématies parasitées par rapport aux hématies saines.

III.3.2. Distribution au niveau ultrastructurale

Les atomes de ruthénium sont opaques aux électrons et sont donc visibles sous forme de « points noirs » lors d'études en microscopie électronique (résolution spatiale : 2 nm). Cette spécificité a été utilisée dans l'examen de la distribution du ruthénium au niveau

intracellulaire dans des hématies parasitées par la souche CQ-sensible HB3 de *P. falciparum* et traitées par de la RQ (40 nM) ou de la RQ-Me avec des temps d'incubation de 15 min et 30 min (*Figure 54*). Afin d'éviter tout artefact expérimental, les études de microscopie électronique en transmission (TEM) ont été réalisées sans coloration.

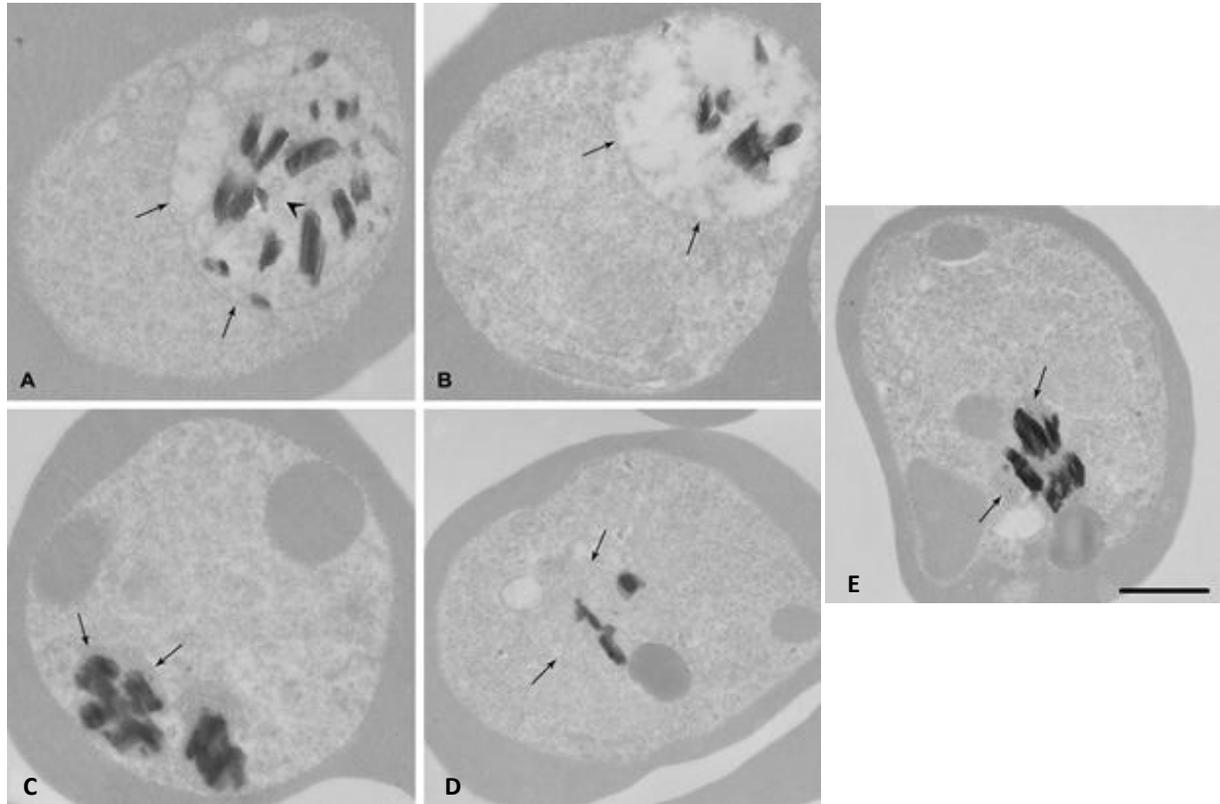


Figure 54 : Images de microscopie électronique en transmission de coupes d'hématies parasitées par la souche CQ-sensible HB3 et traitées par de la RQ avec des temps d'incubation de 15 min (A) et 30 min (B). Images de TEM de coupes d'hématies parasitées par la souche CQ-sensible HB3 et traitées par de la RQ-Me avec des temps d'incubation de 15 min (C) et 30 min (D). Un contrôle (sans traitement) a également été effectué (E). L'échelle correspond à 500 nm. Les petites flèches indiquent les membranes des vacuoles digestives. La grosse flèche indique la position des atomes de ruthénium à proximité des cristaux d'hémozoïne (A).

Comme le montre la *Figure 54 E*, la membrane de la vacuole digestive des parasites non traités est à peine visible par TEM (résolution spatiale: 2 nm). Après seulement 15 min de traitement par la RQ, l'apparition d'un contraste nous permet d'observer clairement la membrane de la vacuole digestive des parasites comparativement à ce qui a été observé pour les parasites non traités (flèches dans la *Figure 54 A*). La cinétique d'accumulation étudiée par

MET est en accord avec les observations faites lors des études d'ICP-MS, ce qui indique que l'accumulation de la sonde s'établit rapidement. Après 30 min de traitement, le contraste augmente et accentue davantage le contour de la vacuole digestive. De plus, un contraste important a également été observé à l'intérieur de cet organelle à proximité des cristaux d'hémozoïne (*Figure 54 B*). D'autre part, ces études ont permis également de révéler l'apparition d'un contraste plus important dans des petites vésicules, probablement des vésicules de transport, suggérant une accumulation d'atomes de ruthénium (et donc potentiellement de RQ). En dehors d'un contraste légèrement plus important à proximité des cristaux d'hémozoïne, aucune différence n'a été détectée entre les parasites exposés à la RQ après 30 min d'incubation et ceux exposés à 15 min d'incubation.

Dans les parasites exposés à la RQ-Me, nous n'avons pas observé d'augmentation de contraste par rapport au contrôle (les parasites non traités), ce qui suggère que la concentration de ruthénium (et donc potentiellement de RQ-Me) est trop faible pour être détectée (limite de résolution spatiale de 2 nm). En effet, l'absence de contraste et donc de détection du ruthénium dans les coupes analysées par TEM ne signifie pas une absence d'accumulation de ruthénium dans les parasites.

Ces observations suggèrent que la FQ s'accumulerait bien dans la vacuole digestive du parasite, à proximité du pigment malarique, et qu'il existerait une relation importante entre son accumulation, son efficacité antipaludique et la présence de la liaison hydrogène intramoléculaire.

III.3.3. Localisation dans la vacuole digestive

Afin de s'assurer que l'augmentation de contraste observée dans l'étude précédente est bien le résultat de l'accumulation d'atomes de Ru dans les membranes et à l'intérieur de la vacuole digestive du parasite, nous avons utilisé les caractéristiques d'émission des atomes de Ru lors de leur exposition aux rayons X grâce à l'utilisation de la nano-imagerie par rayonnement synchrotron basé sur la fluorescence des rayons X. Ces expériences ont été réalisées à l'ESRF en collaboration avec le Dr Sylvain Bohic (European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble). La lumière synchrotron produite à l'ESRF permet d'obtenir une taille de faisceau de rayons X de 60 à 100 nm à une énergie d'excitation de 29 keV. Ces caractéristiques nous ont permis de réaliser notre étude avec une grande sensibilité pour la couche d'excitation K des atomes de Ru et également du Fe, du S et du Cl. De plus, cette

technique permet d'étudier la distribution élémentaire subcellulaire quantitative de certains éléments.(24, 25)

III.3.3.1. Souche CQ-sensible, HB3

III.3.3.1.1. Localisation de la RQ

Les études ont été réalisées sur des hématies infectées par une souche CQ-sensible HB3 et traitées par de la RQ (40 nM) avec un temps d'incubation de 30 min. Un contrôle, non traité a également été réalisé. Les hématies ont été déposées en monocouche sur des cellules en nitrure de silicium de 500 nm d'épaisseur.

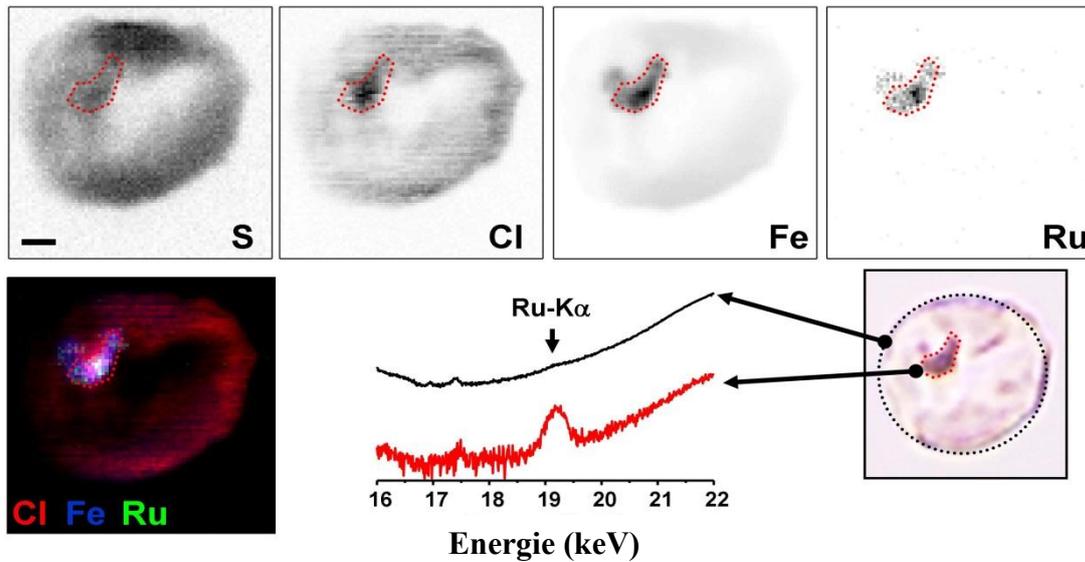
L'image optique (*Figure 55*) des hématies analysées montre que la fixation chimique (méthanol) des cellules, préserve les cellules et que l'hémozoïne est bien délimitée.



Figure 55 : Image optique d'une hématie parasitée par HB3 et traitée par la RQ (40 nM, 30 min), fixée au méthanol sur une cellule en nitrure de silicium de 500 nm.

Nous avons étudié la distribution du Ru dans les cellules et également la distribution du soufre, du fer et du chlore (*Figure 56*).

A) Hématies parasitées traitées par de la ruthenoquine



B) Contrôle

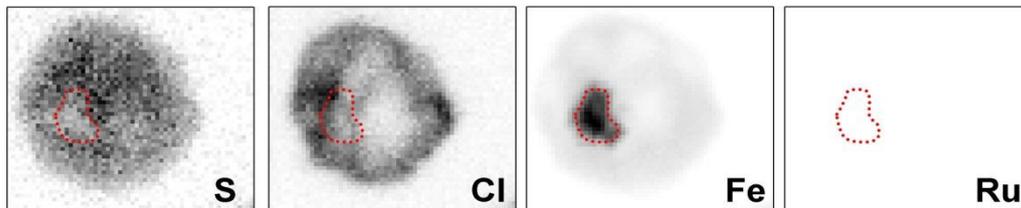


Figure 56 : Nano-imagerie par rayonnement synchrotron en fluorescence des rayons X. (A) Cartes d'hématies infectées par HB3 et incubées pendant 30 min avec de la RQ (40 nM). (B) Cartes de contrôle, hématies non traitées. La barre d'échelle est équivalente à 1 μ m.

Nous avons tout d'abord comparé le spectre de fluorescence X réalisé sur l'ensemble de l'hématie parasitée et traitée (pointillés noirs, Figure 56) avec le spectre réalisé dans la région située autour de l'hémozoïne (pointillés rouges, Figure 56), que nous définissons comme étant la vacuole digestive du parasite. Le Ru n'a pu être détecté sur la cellule entière car le bruit de fond était trop important par rapport à la quantité globale de Ru détectée. En revanche, un signal a été détecté pour la zone de la vacuole digestive ce qui montre que l'on a une accumulation importante de Ru dans cet organelle. En effet, la co-localisation des atomes de Fe et de Ru a permis de démontrer l'accumulation spécifique des atomes de Ru dans la vacuole digestive, à proximité du pigment malarique. Néanmoins, la sensibilité élémentaire ne nous permet pas de visualiser les membranes d'épaisseur 10-20 nm, c'est pourquoi la combinaison de ces résultats avec ceux obtenus avec la TEM (résolution spatiale: 2 nm), sur des coupes ultra-minces de parasites, sont complémentaires pour obtenir toutes les informations qualitatives désirées.

Nous avons ensuite réalisé la localisation des atomes de Cl dans des hématies parasitées par la souche HB3 et traitées par la RQ. Ces données nous ont permis de constater que le Cl apparaît dans une zone similaire à celle obtenue pour le Fe. L'étude du contrôle montre que la quantité de Cl intrinsèque à la vacuole digestive du parasite est négligeable, ce qui laisse supposer que les atomes de Cl observés pourraient correspondre à la RQ. D'autre part, la co-localisation des atomes de Cl et de Ru suggèrent qu'il n'y a pas de clivage entre le noyau quinoléine et le ruthénocène, cela suppose que la RQ est intègre au sein de la vacuole digestive. Malgré la présence d'atomes de Cl dans le milieu de culture et dans les cellules, ces données nous ont poussé à utiliser les atomes de Cl pour la détection directe de la FQ et de la CQ.

III.3.3.1.2. Localisation de la FQ

La localisation de l'accumulation de la RQ dans la vacuole digestive de *P. falciparum* suggèrent que la FQ devrait s'accumuler également dans cet organelle. Nous avons donc réalisé des expériences similaires avec la FQ. Antérieurement, le principal frein aux expériences de localisation directe de la FQ était notre incapacité à différencier les différentes espèces de fer présentes dans la cellule. Le recours à un traceur ou au radiomarquage de celle-ci semblait alors inévitable. L'utilisation de l'atome de Cl présent dans la structure de la FQ permet de s'affranchir de ces problèmes sans modifier la molécule.

Nous avons étudié la localisation de la FQ dans des hématies parasitées par la souche CQ-sensible HB3 de *P. falciparum* à la dose de 40 nM et pour un temps d'incubation de 30min.

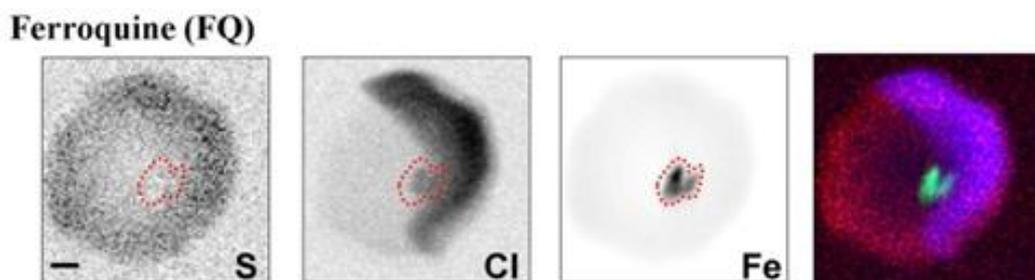


Figure 57 : Distribution *in vitro* de la FQ dans des hématies parasitées par la souche CQ-sensible HB3 de *P. falciparum*. La barre d'échelle est équivalente à 1 μm .

Comme dans le cas de la RQ, la localisation du fer nous permet de délimiter la zone de la vacuole digestive. Précédemment, nous avons établi que la quantité de Cl présente dans la vacuole digestive des parasites non traités, semble négligeable par rapport au Cl présent dans le reste du parasite. De ce fait, nous pouvons conclure que la co-localisation des atomes de Fe et des atomes de Cl montre une accumulation claire de la FQ dans la vacuole digestive du parasite (souche HB3 de *P. falciparum*).

III.3.3.1.3. Localisation de la CQ

Comme vu précédemment, des études utilisant la $^3\text{H-CQ}$ ont permis de montrer que la CQ s'accumulerait dans la vacuole digestive de *P. falciparum*.(26, 27) Nous nous sommes intéressés à la localisation de la CQ dans des hématies parasitées par la souche CQ-sensible HB3 de *P. falciparum*. Cette étude a été réalisée dans les mêmes conditions que celles précédemment utilisées avec la RQ et la FQ, c'est-à-dire en utilisant une concentration initiale de CQ de 40 nM et un temps d'incubation de 30 min. Contrairement aux études antérieures, ces analyses ont été effectuées sur la CQ, sans modification préalable. Comme pour la FQ, nous avons réalisé une co-localisation des atomes de Fe et des atomes de Cl.

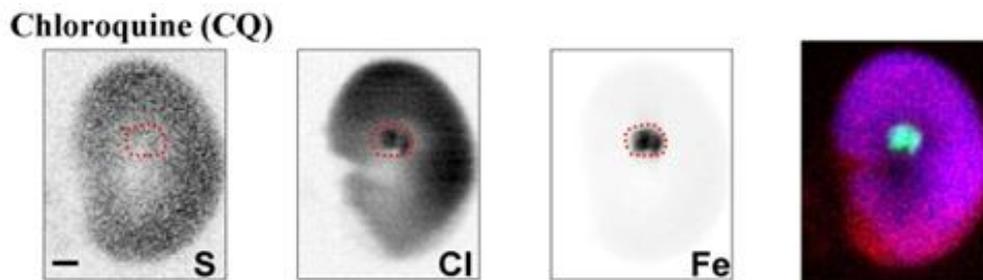


Figure 58 : Distribution *in vitro* de la CQ dans des hématies parasitées par la souche CQ-sensible HB3 de *P. falciparum*. La barre d'échelle est équivalente à 1 μm .

La co-localisation des atomes de Fe et des atomes de Cl montrent que contrairement à ce qui a été observé dans le cas de la FQ et de la RQ, les atomes de Cl ne sont pas principalement localisés dans la vacuole digestive mais qu'ils sont présents de manière diffuse dans l'ensemble du parasite. Ces données suggèrent qu'à 30 min et à la dose de 40 nM, la FQ et la RQ s'accumuleraient plus efficacement que la Cl à l'intérieur du compartiment vacuolaire du parasite *P. falciparum* (HB3).

III.3.3.2. Souche CQ-résistante, W2

De nombreux travaux se sont intéressés à la différence d'accumulation de la CQ dans la vacuole digestive du parasite entre les souches CQ-sensibles et les souches CQ-résistantes. Dès la première étude, les chercheurs ont montré que les souches CQ-résistantes accumulent moins de CQ que les souches CQ-sensibles. Ce phénomène a été expliqué par une augmentation de l'efflux de la molécule en dehors du compartiment vacuolaire.

D'autre part, comme démontré précédemment, l'activité de la FQ ne serait pas corrélée aux polymorphismes des gènes associés à la résistance de *P. falciparum* envers les médicaments quinoléiques. Ces données suggèrent que nous ne devrions pas observer de différence d'accumulation entre une souche CQ-sensible et une souche CQ-résistante. Pour réaliser cette étude, nous nous sommes intéressés à la souche CQ-résistante W2 que nous avons exposé à de la FQ ou de la CQ à des doses de 40 nM et avec des temps d'incubation de 30 min.

III.3.3.2.1. Localisation de la CQ

Les expériences de localisation de la CQ dans des hématies parasitées par W2 ont été réalisées dans les mêmes conditions préparatoires que celles réalisées sur la souche CQ-sensible, HB3. Une comparaison avec des hématies parasitées non traitées a également été effectuée.

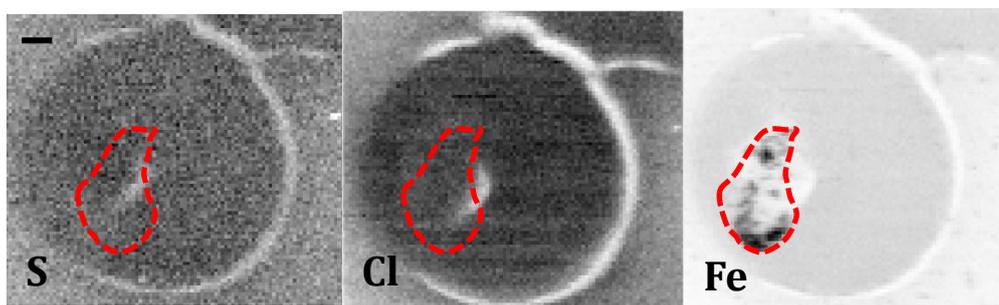


Figure 59 : Distribution élémentaire du S, du Cl et du Fe dans une hématie parasitée par la souche CQ-résistante W2 (sans traitement, Contrôle). La barre d'échelle est équivalente à 1 μm .

Comme dans le cas des hématies parasitées par HB3, le signal du fer correspond parfaitement à l'emplacement des cristaux d'hémozoïne, c'est pourquoi nous avons considéré que cette zone correspond à la vacuole digestive du parasite. Dans les érythrocytes infectés par W2, le signal correspondant aux atomes de Cl est réparti de manière homogène dans toute la cellule (*Figure 59*). Une remarque identique peut être faite pour les atomes de S (*Figure 59*).

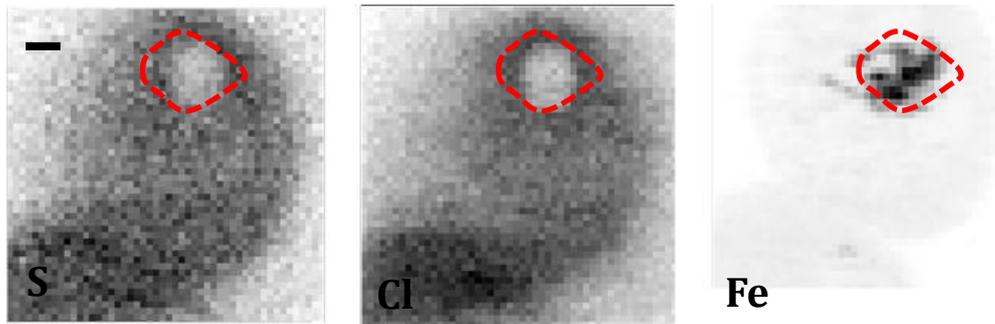


Figure 60 : Distribution *in vitro* de la CQ dans des hématies parasitées par la souche CQ-résistante W2 de *P. falciparum*. La barre d'échelle est équivalente à 1 μm .

Dans les hématies infectées par W2 et traitées par la CQ, la co-localisation des atomes de Fe et des atomes de Cl montre que la zone correspondant à la vacuole digestive présente une atténuation du signal du Cl. Ces résultats contrastent avec ceux obtenus pour les hématies parasitées par HB3. En effet, malgré une diffusion importante, un signal correspondant aux atomes de Cl a été détecté dans toute la cellule, y compris dans la vacuole digestive. Ici, le signal est absent de la vacuole digestive, suggérant un efflux de la CQ en dehors de la vacuole digestive du parasite. Ce qui est en accord avec les données de la littérature.

III.3.3.2.2. Localisation de la FQ

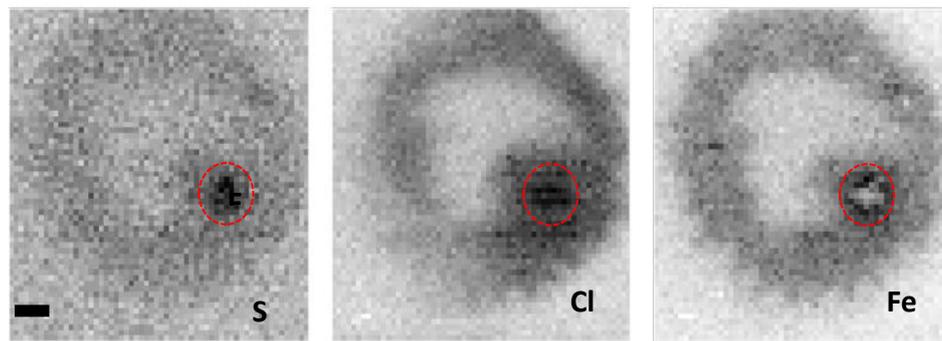


Figure 61 : Distribution *in vitro* de la FQ dans des hématies parasitées par la souche CQ-résistante W2 de *P. falciparum*. La barre d'échelle est équivalente à 1 μm .

Comme dans le cas des hématies parasitées par HB3, la co-localisation des atomes de Fe et des atomes de Cl montre clairement que la FQ s'accumule dans la vacuole digestive du parasite. Ces données sont en accord avec une étude de Pradines et coll. qui avait suggéré que les protéines de transport impliquées dans la résistance aux médicaments quinoléiques, ne sont pas capables d'interagir avec la FQ et que de ce fait, aucun phénomène d'efflux ne serait observé.

De manière tout à fait intéressante et contrairement à ce qui a été observé dans le cas des expériences réalisées sur la souche HB3, la co-localisation des atomes de Fe correspond parfaitement avec une accumulation du signal produit par les atomes de S. Ces données indiquent qu'un autre composé contenant du S s'est accumulé à l'intérieur de la vacuole digestive du parasite.

Comme nous l'avons vu précédemment, durant le processus de digestion de l'hémoglobine, le parasite est exposé à des flux élevés d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Plusieurs espèces sont connues pour protéger le parasite contre ces processus oxydatifs, tel que le glutathion (GSH), un tripeptide de l'acide glutamique, la cystéine, et la glycine.(28, 29) Bien que nous ne pouvons pas exclure la présence d'une protéine contenant du soufre,(30) l'hypothèse la plus probable est que cette accumulation intracellulaire d'atome de S est due à une plus forte concentration en GSH dans les globules rouges infectés par W2 et traités par la FQ par rapport à ceux traités par la CQ. En effet, précédemment, nous avons montré que la FQ pourrait induire un stress oxydatif au parasite. De plus, il a été montré qu'un apport

exogène de stress oxydatif pouvait être contrôlé par une augmentation du taux de GSH dans les parasites CQ-résistants.(31)

Récemment, il a été montré chez *P. berghei* que les souches résistantes à l'artéether présentent des modifications importantes de leurs activités enzymatiques antioxydantes ainsi qu'une augmentation importante du niveau de GSH, comparativement à ce qui a été observé chez une souche sensible.(32) Le GSH pourrait donc jouer un rôle à la fois dans la protection du parasite vis-à-vis de l'hème libre(28, 33) mais également contre les ROS(34) induits lors de la digestion de l'hémozoïne. Cette étude suggère que la production de ROS engendrée par l'artéether pourrait provoquer une augmentation de la quantité de GSH visant ainsi à créer un environnement plus favorable à la survie du parasite.(32) De plus, des niveaux accrus de GSH et des changements de l'activité enzymatique antioxydante ont également été signalés dans des souches CQ-résistantes de *P. falciparum* (31), *P. berghei*(35) et *P. chabaudi*(36).

D'autre part, nous avons établi que dans les conditions oxydantes de la vacuole digestive du parasite, la FQ est capable de générer la production de radicaux HO° donc de promouvoir le stress oxydatif chez le parasite. De plus, l'accumulation importante de FQ dans la vacuole digestive du parasite, suggèrent que c'est dans cet organelle que l'accumulation de ROS, et plus particulièrement de radicaux HO°, serait prépondérante. Une augmentation du niveau de stress oxydatif dans cet organelle pourrait avoir pour effet une augmentation de la présence des systèmes de détoxification, et certainement de la quantité de GSH dans la vacuole digestive de *P. falciparum*.

III.3.3.3. Comparaisons d'accumulation entre la CQ et la FQ

Nous avons comparé la distribution subcellulaire de la FQ et de la CQ dans des hématies parasitées par les souches CQ-sensible HB3 et CQ-résistante W2 de *P. falciparum*. Après avoir superposé les cartographies obtenues (*Figure 62*) pour le S (en rouge), le Fe (en vert) et le Cl (en bleu).

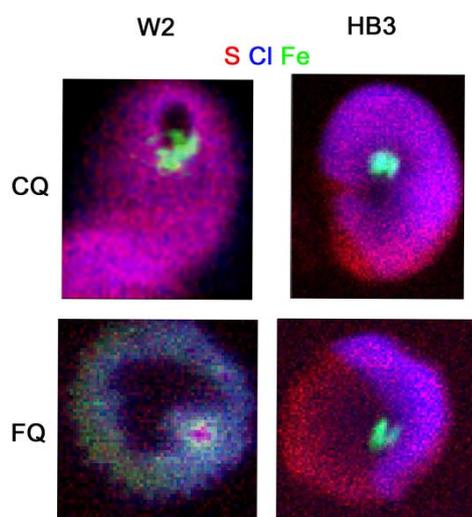


Figure 62 : Distribution subcellulaire de la FQ et de la CQ dans des hématies parasitées par les souches CQ-sensible HB3 et CQ-résistante W2 de *P. falciparum*.

Ces données démontrent que les parasites CQ-résistants W2 présentent une accumulation de soufre dans leur vacuole digestive alors que la CQ présente un signal diffus, similaire à celui observé pour la souche CQ-sensible HB3. La CQ ne comportant pas d'atome capable d'engendrer des réactions de type Fenton, ne pourrait donc pas engendrer une surproduction de radicaux HO°. De plus, la CQ ne s'accumule pas dans la vacuole digestive, aucune augmentation du signal du S n'a été observée.

Comme précisé précédemment, la nano-imagerie par rayonnement synchrotron permet de réaliser la quantification relative subcellulaire élémentaire de différents éléments. Nous avons étudié les rapports entre les intensités du Cl et du Fe et entre les intensités du S et du Fe pour les érythrocytes infectés par la souche CQ-résistante W2 de *P. falciparum*. Cette étude a été réalisée sur une population de quatre érythrocytes différents par expérience (n=4).

Composés	Rapport Cl/Fe	Rapport S/Fe
CQ	1,6 ± 0,5	1,2 ± 0,3
FQ	2,4 ± 0,3	1,8 ± 0,3

Tableau 16 : Rapports Cl/Fe et S/Fe mesurés dans la vacuole digestive de parasites CQ-résistants W2 traités par de la CQ ou par de la FQ.

Ces résultats sont en accord avec les observations précédentes et montrent que la FQ engendre une augmentation du stress oxydatif à l'intérieur de la vacuole digestive. De plus

l'ensemble de ces résultats ont permis de démontrer que la FQ est capable de s'accumuler à l'intérieur de la vacuole digestive quel que soit le degré de sensibilité de la souche étudiée, suggérant que les mécanismes de transport impliqués dans la résistance aux quinoléines ne sont pas capables de prendre en charge la FQ.

III.4. Comportement rédox de la FQ

Les précédents résultats suggèrent que le comportement rédox de la FQ serait impliqué dans le mécanisme d'action de la FQ. Dans un premier temps, nous avons étudié l'ultrastructure de parasites traités par la CQ, la FQ, la FQ-Me, la RQ et la RQ-Me par TEM. Dans un second temps, nous avons étudié la production des radicaux HO° à l'intérieur du compartiment vacuolaire à l'aide d'une sonde ratiométrique par microscopie confocale.

III.4.1. Effets ultrastructuraux

Précédemment, nous avons étudié la distribution ultrastructurale de la RQ dans des hématies parasitées par la souche CQ-sensible HB3 et traitées par de la RQ à une dose de 40 nM et pour un temps de 15 et 30 min. Lors de ces expériences, nous avons observé une différence du contraste entre les différents temps pour la RQ. En effet, après 30 min, la RQ semblait plus accumulée à l'intérieur de la vacuole digestive du parasite. C'est pourquoi, nous avons choisi pour cette étude de travailler à un temps d'incubation de 60 min afin d'avoir une concentration suffisante des molécules pour pouvoir observer les éventuels changements ultrastructuraux.

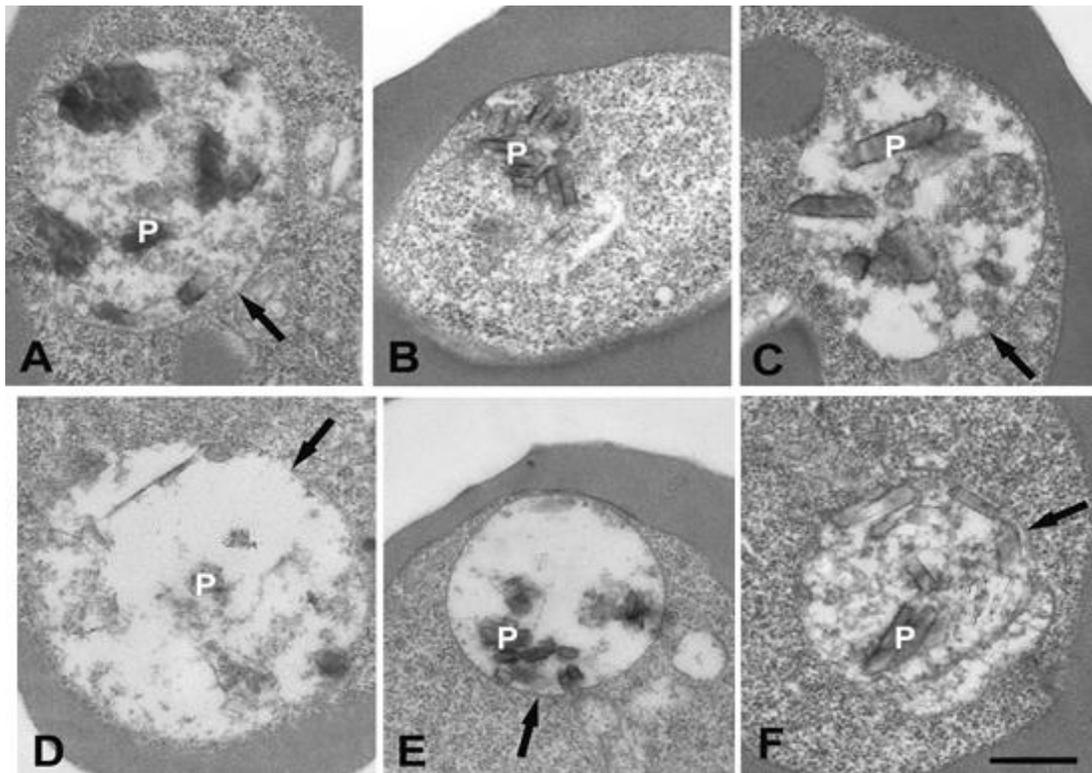


Figure 63 : Ultrastructure de parasites CQ-sensibles HB3 (contrôle, A) traités par de la FQ (B), de la RQ (C), de la FQ-Me (D et E) ou de la RQ-Me (F). Les flèches indiquent la membrane de la vacuole digestive, la lettre P indique le pigment malarique.

La culture contrôle (*Figure 63, A*) montre une vacuole digestive normale bien délimitée contenant des cristaux d'hémozoïne. Dans les parasites traités par la FQ (*Figure 63, B*), les cristaux d'hémozoïne sont soit regroupés, soit dispersés dans le cytoplasme. De plus, dans la plupart des parasites observés, la membrane de la vacuole digestive n'est pas visible. Dans les parasites traités avec la RQ (*Figure 63, C*), la vacuole digestive est bien conservée, avec une totale intégrité de sa membrane. Dans les parasites traités par la FQ-Me (*Figure 63, D et E*), de faibles altérations de la membrane vacuolaire ont été observées. Dans les parasites traités par la RQ-Me (*Figure 63, F*), la membrane de la vacuole digestive est intacte.

La membrane de la vacuole digestive présente des altérations après un traitement avec la FQ ou la FQ-Me. Seules les molécules contenant un groupement ferrocène sont donc capables d'endommager la membrane de la vacuole digestive. Les radicaux hydroxyles étant connus pour être impliqués dans les phénomènes de peroxydation lipidique, ces données suggèrent que le potentiel rédox de la FQ et de la FQ-Me présente un réel intérêt dans le mécanisme d'action de ces molécules. Les dommages observés après un traitement par la FQ-

Me sont moins importants que ceux engendrés par la FQ. De plus, la comparaison de l'accumulation entre la RQ-Me et la RQ en ICP-MS avait permis de montrer que la RQ s'accumule plus efficacement dans les hématies parasitées que la RQ-Me. Ces résultats suggèrent que la différence d'activité est probablement due à une moins bonne accumulation de la FQ-Me au sein du compartiment vacuolaire par rapport à la FQ.

D'autre part, bien que les cristaux d'hémozoïne présentent des formes proches (*Figure 63*), il est à noter que dans les parasites traités par la FQ, ces cristaux apparaissent exceptionnellement minces (50 nm), alors que les cristaux observés dans les cultures contrôles ou dans les cultures traitées par de la RQ apparaissent beaucoup plus épais (90-110 nm).

Ces résultats suggèrent que la FQ pourrait être un meilleur inhibiteur de la croissance du pigment malarique que les autres molécules ou serait capable d'engendrer la destruction du pigment malarique, libérant des molécules d'hème libre.

III.4.2. Production de radicaux HO° dans la vacuole digestive

III.4.2.1. Sonde ratiométrique fluorescente pour la détection des radicaux HO°

La microscopie à fluorescence est une méthode puissante pour l'étude des processus physiologiques présents chez *P. falciparum*. Cette technique a été utilisée pour mesurer le pH intracellulaire de *P. falciparum* au stade intra-érythrocytaire mais également pour mesurer des concentrations d'ions, pour étudier la signalisation de Ca²⁺ et pour étudier des protéines cibles.(37–42) La microscopie de fluorescence permet d'étudier les cellules directement et de séparer spatialement les signaux provenant à la fois du parasite mais également de l'hématie environnante. D'autre part, les compartiments sub-cellulaires, comme la vacuole digestive, peuvent également être visualisés.(39) Néanmoins, il est important de noter que malgré des avantages certains, l'utilisation de cette technique engendre des préoccupations.(43)

En effet, il a été montré que l'un des inconvénients majeurs est la variabilité entre les cellules, ce qui nécessite un nombre relativement important d'expériences pour obtenir des mesures statistiquement significatives.(44) De plus, la reproductibilité entre les différentes études semble être relative. Pour illustrer prenons l'exemple de l'étude de la comparaison du pH cytosolique du parasite entre des souches CQ-sensibles et CQ-résistantes de *P. falciparum*. Certaines études ont montré une différence alors que d'autres études n'ont pas pu vérifier cette observation.(37, 45–48) Ces différences peuvent être dues à une mauvaise interprétation des

données de fluorescence. Néanmoins, il a été suggéré que cette explication n'est pas suffisante et qu'une exposition prolongée à la lumière fluorescente pouvait engendrer des modifications dans les propriétés physiologiques du parasite *P. falciparum*.(44) Une étude a montré qu'une faible exposition en fluorescence pouvait engendrer une acidification du compartiment cytoplasmique. D'autre part, une exposition à la lumière fluorescente engendrerait une augmentation des radicaux HO° à l'intérieur de cellules vivantes et notamment à l'intérieur du compartiment vacuolaire.(44)

Ce type de données devront donc faire l'objet d'une analyse rigoureuse. Bien que l'intensité de la fluorescence soit en relation directe avec la concentration de la sonde dans le milieu étudié, elle reste l'un des paramètres les plus couramment étudiés. Toutefois, il est important de souligner le fait que dans les milieux cellulaires, cette concentration peut être difficilement maîtrisée, ce qui peut conduire à des artefacts dans l'interprétation des résultats. Récemment plusieurs sondes fluorescentes ont été décrites pour la détection des radicaux hydroxyles dans des cellules.(49–53) Pourtant, certaines de ces sondes présentent une mauvaise sélectivité pour les radicaux hydroxyles comparativement aux autres ROS, tels que ROO°, O₂⁻, ClO⁻, H₂O₂, ONOO⁻. De plus, la plupart de ces sondes fluorescentes permettent de détecter les radicaux hydroxyles par analyse des changements de l'intensité de fluorescence à une seule longueur d'onde. L'utilisation de sondes ratiométriques peut permettre de pallier à ces problèmes.(54) En effet, le principe de ces sondes est de permettre la mesure d'un rapport d'intensités indépendant de la concentration, et ainsi de pouvoir s'affranchir de la plupart des effets environnementaux, c'est-à-dire des variations de concentration de la sonde, de l'environnement de la sonde, et de l'intensité d'excitation.

Les dérivés de coumarine présentent des propriétés de fluorescence et peuvent être utilisés comme sondes dans l'étude de différents paramètres.(55–57) La diversité des composés analogues de la coumarine est très importante, aussi, dans ce travail de thèse nous nous sommes uniquement intéressés à l'une d'entre elles(58), permettant la détection des radicaux HO°.

Récemment une sonde ratiométrique basée sur un système hybride coumarine-cyanine a été décrite pour la détection des radicaux HO° dans des cellules vivantes.(58) La molécule hybride coumarine-cyanine a été sélectionnée pour ses propriétés photophysiques favorables. En effet, elle présente un maximum d'émission à 650 nm dans l'infrarouge proche (650-900 nm) alors que la plupart des échantillons biologiques possèdent une fluorescence de fond

relativement faible dans cette région.(59, 60) De plus, cet hybride présente un changement relativement important de la région de Stokes(61), c'est-à-dire de la différence entre la position du pic du spectre d'absorption et le pic du spectre d'émission. La détection d'une espèce fluorescente est d'autant plus facile que le déplacement de Stokes est grand.

La synthèse de cette sonde est résumée ci-après :

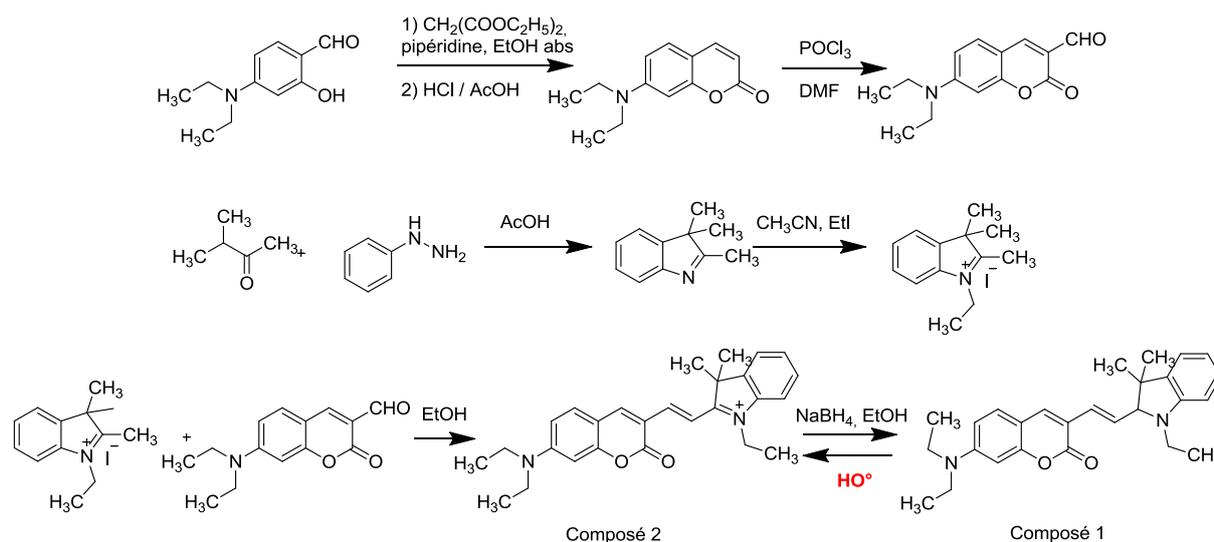


Figure 64 : Synthèse de la sonde fluorescente ratiométrique coumarine-cyanine.

Le 7-diéthylaminocoumarine est obtenu par combinaison du 4-diéthylaminosalicylaldéhyde, du diéthylmalonate en présence de pipéridine dans l'éthanol absolu. Une réaction de Vilsmeier-Haak avec le trichlorure de phosphore permet d'aboutir au 7-diéthylaminocoumarin-3-aldéhyde.(62)

L'indole est obtenu par réaction du 3-méthylbutan-2-one avec la phénylhydrazine dans l'acide acétique, par une synthèse de Fischer. Le traitement de cet indole par de l'iodure d'éthyle permet la synthèse d'un indolium. La condensation de l'indolium avec le dérivé coumarine aldéhyde a engendré la formation du composé 2 . La réduction du composé 2 permet d'obtenir la sonde ratiométrique, annotée composé 1.(58)

Comme précisé dans la figure 64, l'action des radicaux HO° engendre le passage du composé 1 vers le composé 2. Les auteurs ont donc étudié les propriétés spectrales (Figure 65) de ces deux composés.

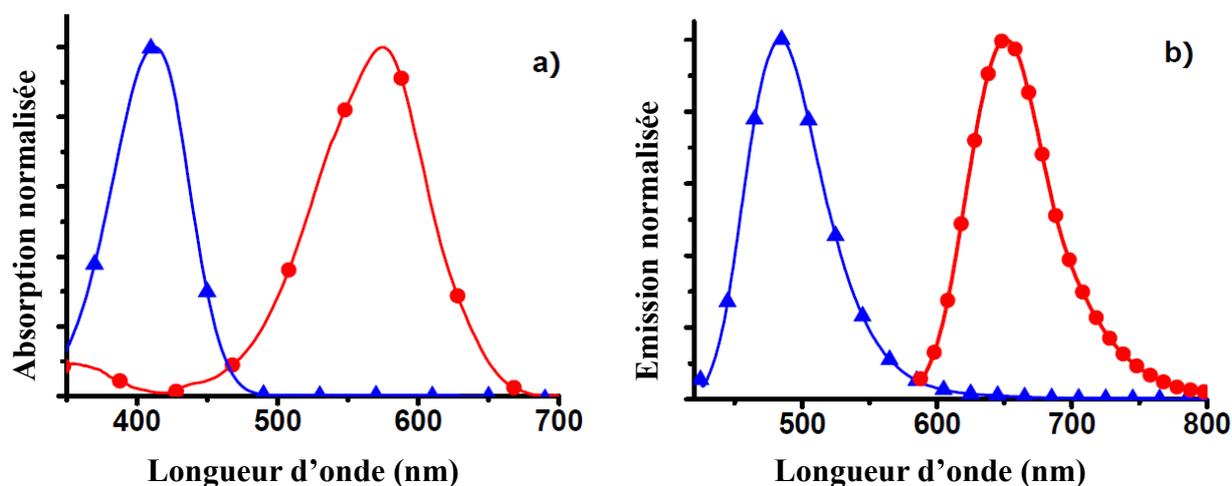


Figure 65 : Spectres normalisés d'absorption (a) et d'émission (b) du composé 1 (bleu) et du composé 2 (rouge). Le spectre d'émission a été enregistré à une excitation correspondante au maximum d'absorption de chaque composé.(58)

La sonde (composé 1) présente une bande d'émission centrée à 495 nm. L'introduction de radicaux hydroxyles dans le milieu engendre une diminution marquée de l'intensité d'émission à 495 nm ainsi qu'une augmentation significative de l'intensité d'émission à 651 nm. De plus, le ratio d'intensité de la fluorescence de la sonde à 495 et 651 nm (I_{651}/I_{495}) a été radicalement modifié lors de l'ajout de radicaux HO° , passant de 0,018 à 3,8, soit 210 fois plus élevé. D'autre part, la sélectivité de la sonde a été testée (Figure 66) en mesurant les rapports d'intensité d'émission de la sonde en présence de différents analytes (H_2O_2 , O_2^- , ClO^- , $\text{CH}_3\text{CO}_3\text{H}$, O_2 , GSH, Fe^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , NO_3^- , NO_2^-). Les résultats montrent que la sonde est très sélective envers les radicaux HO° comparativement aux autres analytes étudiés.

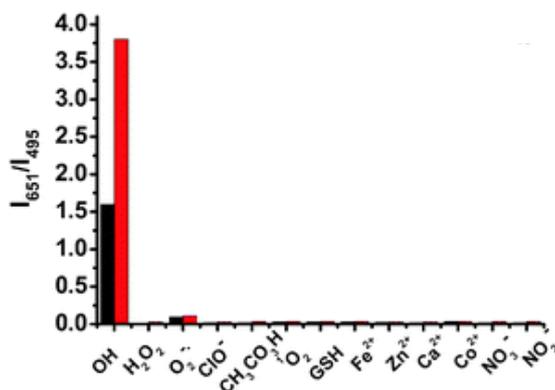


Figure 66 : Rapport des intensités d'émission de la sonde (20 μ M) en présence de différents analytes (25 eq).

D'autre part, il a été montré que cette sonde est très stable à l'auto-oxydation. De plus, des expériences sur des cellules Hela vivantes ont permis de montrer que la sonde est capable de s'accumuler à l'intérieur de la cellule vivante et de présenter une réponse fluorescente en présence de radicaux HO $^{\circ}$.(58)

III.4.2.2. Détection des radicaux hydroxyles dans *P. falciparum*

Comme vu précédemment, lors du processus de digestion de l'hémoglobine, des radicaux de type HO $^{\circ}$ sont produits à l'intérieur du compartiment vacuolaire. D'autre part, dans les conditions oxydantes de la vacuole digestive, la FQ est capable d'engendrer la formation de ce type de radicaux par des réactions de type Fenton. L'analyse ultrastructurale des parasites traités par la FQ suggèrent que le comportement rédox de la FQ engendrerait des dommages sur la membrane de la vacuole digestive. Nous avons donc émis l'hypothèse que la présence de FQ dans la vacuole digestive du parasite pouvait générer une augmentation de la production de radicaux HO $^{\circ}$.

La synthèse de la sonde a été réalisée grâce à la voie de synthèse évoquée précédemment (Figure 64).

Dans un premier temps, nous avons étudié la fluorescence intrinsèque (sans incubation de la sonde) des globules rouges non parasités, aux longueurs d'onde d'intérêt, par microscopie confocale.

Dans la suite des expériences présentées, les longueurs d'onde d'excitation sont 405 nm pour le laser UV, 488 nm pour le laser bleu et 545 nm pour le laser vert et les longueurs d'onde d'émission sont 460nm, 510 nm et 580 nm respectivement.



Figure 67 : Images de microscopie confocale obtenues avec des hématies saines non traitées et non incubées avec la sonde ratiométrique.

Ces images montrent que la fluorescence intrinsèque des hématies est quasiment nulle.

Comme vu précédemment, il a été montré que les érythrocytes parasités par *P. falciparum* produisent des espèces radicalaires alors que les érythrocytes sains non.(63–65) Cependant, ces différentes études ne précisent pas la nature de ces ROS. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'une partie de ces ROS sont des radicaux HO°. La fluorescence intrinsèque de la souche CQ-résistante FcB-1 de *P. falciparum* a été étudiée en absence ou en présence de la sonde ratiométrique.

Nous avons déterminé les ratios d'intensité de fluorescence $I_{\text{rouge}}/I_{\text{vert}}$, dans les globules rouges parasités par FcB1, non traités et non incubés par la sonde, pour la zone du cytoplasme, du noyau, localisé grâce au DAPI et de la vacuole digestive à proximité des cristaux d'hémozoïne. Un ratio identique a été trouvé pour ces trois zones et est de $0,4 \pm 0,2$ (n=12).

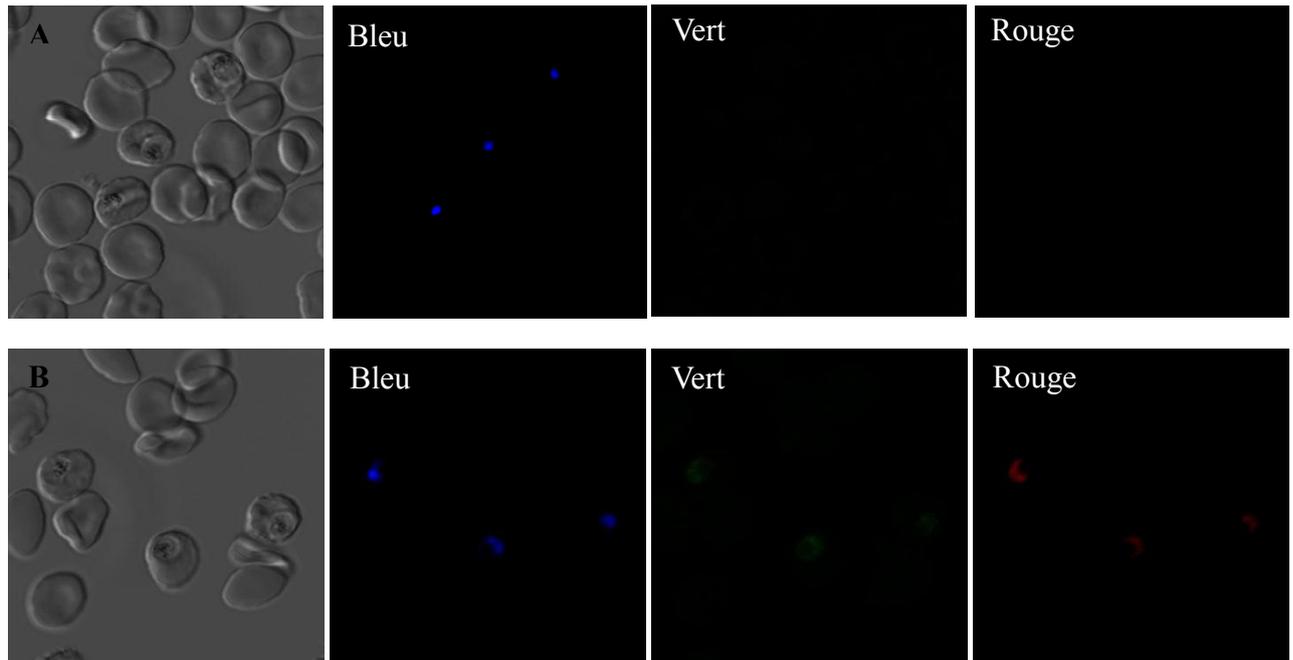


Figure 68 : Images de microscopie confocale obtenus avec A) des hématies parasitées par la souche CQ-résistante FcB-1, non traitées et non incubées avec la sonde ratiométrique (incubées au DAPI) ; B) des hématies parasitées par la souche CQ-résistante FcB-1, non traitées et incubées avec la sonde ratiométrique (40 μ M, 5 min), puis incubées au DAPI.

Ces images montrent qu'en l'absence de sonde, l'intensité de fluorescence des parasites CQ-résistants FcB-1 est quasiment nulle alors que l'ajout de la sonde engendre l'apparition d'un signal pour le filtre rouge et pour le filtre vert.

Dans le cytoplasme, l'ajout de la sonde engendre une augmentation du ratio d'intensité de fluorescence $I_{\text{rouge}}/I_{\text{vert}}$ de $0,4 \pm 0,2$ (n = 9) à $3,9 \pm 0,4$ (n = 8), soit une augmentation de presque 10 fois supérieure.

Dans le noyau, l'ajout de la sonde engendre une augmentation du ratio d'intensité de fluorescence $I_{\text{rouge}}/I_{\text{vert}}$ de $0,4 \pm 0,2$ (n = 9) à $3,2 \pm 0,4$ (n = 8), soit une augmentation de 8 fois supérieure.

Dans la vacuole digestive, l'ajout de la sonde n'a pas d'effet sur le ratio d'intensité de fluorescence $I_{\text{rouge}}/I_{\text{vert}}$.

Ces résultats montrent que la sonde entre dans les hématies parasitées et s'accumule à l'intérieur du parasite au niveau du cytoplasme, du noyau et de la vacuole digestive.

L'augmentation des ratios $I_{\text{rouge}}/I_{\text{vert}}$ calculés dans le cytoplasme ou dans le noyau suggère la présence de radicaux HO° dans ces compartiments. L'absence d'effet observé dans la vacuole digestive suggère qu'il n'y a pas de radicaux HO° dans ce compartiment acide ou que cette quantité est trop faible pour être détectée.

Nous avons ensuite étudié l'influence de l'ajout de CQ ou de FQ sur les ratios calculés pour ces différents compartiments.

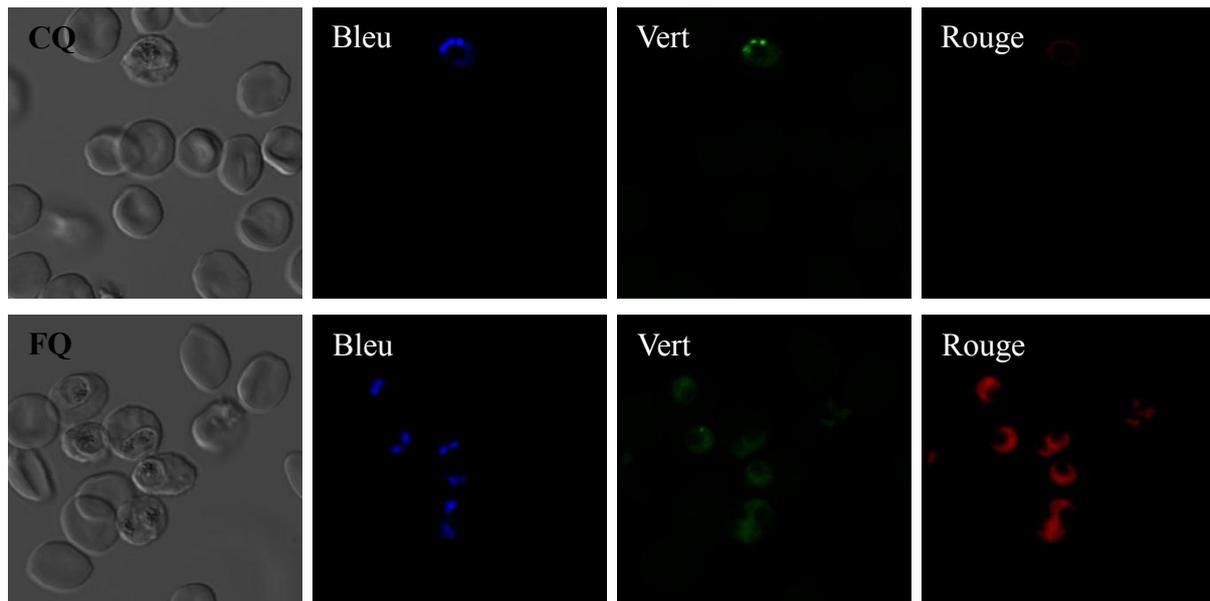


Figure 69 : Images de microscopie confocale obtenues avec : CQ) des hématies parasitées par la souche CQ-résistante FcB-1, traitées par de la CQ et incubées avec la sonde ratiométrique, puis incubées au DAPI ; FQ) des hématies parasitées par la souche CQ-résistante FcB-1, traitées par de la FQ et incubées avec la sonde ratiométrique, puis incubées au DAPI.

Dans les deux cas, on observe une accumulation de la sonde dans les hématies parasitées. L'intensité de la fluorescence d'émission mesurée dans le rouge semble plus importante après un traitement à la FQ qu'après un traitement à la CQ. Sur ces clichés, on observe une diminution de l'intensité de la fluorescence de la sonde (aux deux longueurs d'onde d'émission) qui correspond à la zone de la vacuole digestive. Les cristaux d'hémozoïne pourraient absorber une partie de la lumière émise. Toutefois, le calcul des ratios d'intensité a été réalisé dans la vacuole digestive, à proximité du pigment malarique mais dans une zone sans pigment afin de réduire au maximum ce phénomène.

	N (nombre d'hématies étudiées)	Moyenne ratio $I_{\text{rouge}}/I_{\text{vert}}$	Ecart-type ratio $I_{\text{rouge}}/I_{\text{vert}}$
Parasitées	9	0,4	0,2
Parasitées et sondées	8	3,9	0,4
Parasitées, sondées et traitées	9	0,1	0,1
CQ			
Parasitées, sondées et traitées	14	4	0,7
FQ			

Tableau 17 : Ratios $I_{\text{rouge}}/I_{\text{vert}}$ calculés dans le cytoplasme de *P. falciparum*.

Dans le cytoplasme, l'ajout de CQ engendre une diminution du ratio $I_{\text{rouge}}/I_{\text{vert}}$ calculé, comparativement à ce qui a été déterminé pour les parasites non traités. L'ajout de FQ ne modifie pas la valeur du ratio $I_{\text{rouge}}/I_{\text{vert}}$.

	N (nombre d'hématies étudiées)	Moyenne ratio $I_{\text{rouge}}/I_{\text{vert}}$	Ecart-type ratio $I_{\text{rouge}}/I_{\text{vert}}$
Parasitées	10	0,4	0,2
Parasitées et sondées	11	3,2	0,4
Parasitées, sondées et traitées	9	0,4	0,3
CQ			
Parasitées, sondées et traitées	16	3,9	0,8
FQ			

Tableau 18 : Ratios $I_{\text{rouge}}/I_{\text{vert}}$ calculés dans le noyau de *P. falciparum*.

Dans le noyau, l'ajout de CQ engendre une diminution du ratio $I_{\text{rouge}}/I_{\text{vert}}$ calculé, comparativement à ce qui a été déterminé pour les parasites non traités. L'ajout de FQ ne modifie pas la valeur du ratio $I_{\text{rouge}}/I_{\text{vert}}$.

	N (nombre d'hématies étudiées)	Moyenne ratio $I_{\text{rouge}}/I_{\text{vert}}$	Ecart-type ratio $I_{\text{rouge}}/I_{\text{vert}}$
Parasitées	9	0,4	0,2
Parasitées et sondées	13	0,3	0,1
Parasitées, sondées et traitées	9	0,0	0,0
CQ			
Parasitées, sondées et traitées	16	2,0	0,5
FQ			

Tableau 19 : Ratios $I_{\text{rouge}}/I_{\text{vert}}$ calculés dans la vacuole digestive de *P. falciparum*.

Dans la vacuole digestive, l'ajout de CQ engendre une diminution du ratio $I_{\text{rouge}}/I_{\text{vert}}$ calculé, comparativement à ce qui a été déterminé pour les parasites non traités. L'ajout de FQ engendre une augmentation du ratio $I_{\text{rouge}}/I_{\text{vert}}$ calculé.

Ces données suggèrent que la CQ engendrerait donc une diminution de la production des radicaux hydroxyles dans le noyau, le cytoplasme et la vacuole digestive. Plusieurs études se sont intéressées à la capacité de la CQ à générer du stress oxydatif, très récemment, une revue bibliographique a permis de faire le point sur les données actuelles.(66) Toutefois, malgré un grand nombre d'études en faveur d'un tel mécanisme, aucune conclusion n'a pu être réellement établie. Il est à noter que notre étude concerne uniquement les radicaux HO° et non la totalité des ROS produits dans le parasite. Par ailleurs, il avait été montré que la CQ est capable d'engendrer une diminution de la concentration en radicaux HO° dans des neutrophiles humains stimulés au zymosan c'est-à-dire des neutrophiles produisant des radicaux HO° .(67)

Les résultats de cette étude suggèrent que la FQ n'engendrerait donc pas d'augmentation de la production des radicaux HO° dans le noyau et dans le cytoplasme. D'autre part, l'augmentation du ratio $I_{\text{rouge}}/I_{\text{vert}}$ calculé dans la vacuole digestive montre que la FQ génère une augmentation de la production de radicaux HO° dans le compartiment acide.

Ces résultats ont été obtenus chez FcB1 qui est une souche CQ-résistante de *P. falciparum*. Des expériences similaires devront être réalisées sur une souche CQ-sensible pour étayer les conclusions.

III.5. Mécanisme d'action dans le site d'action

Les données évoquées précédemment montrent clairement que la FQ agit au niveau de la vacuole digestive à proximité des cristaux d'hémozoïne, ce qui nous conforte dans l'idée que la FQ inhiberait la nucléation et/ou la croissance du pigment malarique. Nous avons tout d'abord étudié la capacité de nos molécules à inhiber la formation de la β -hématine en solution. Ensuite, des études de modélisation moléculaire nous ont permis de proposer des sites de liaison de la FQ sur les faces du cristal d'hémozoïne.

III.5.1. Association de l'hématine avec la FQ, la RQ, la FQ-Me et la RQ-Me

Les constantes d'affinité ($\log K$) ont été déterminées en collaboration avec le groupe du Pr. Timothy Egan (Department of Chemistry, University of Cape Town, South Africa) selon la méthode précédemment reportée.(68) L'absorbance est mesurée à 402 nm, correspondant à la bande de Soret de l'hématine, en fonction de la concentration en FQ, RQ, FQ-Me ou RQ-Me.

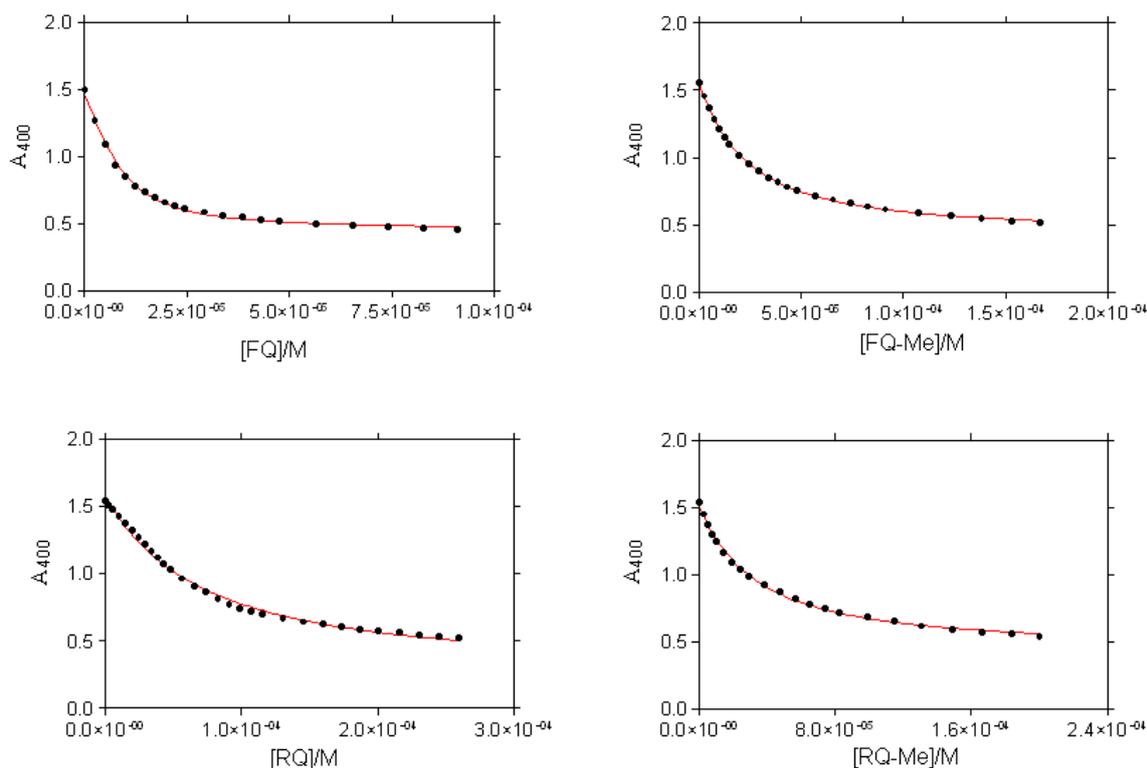


Figure 70 : Variation de l'absorbance de l'hématine à 400 nm en fonction de la concentration des composés.

Les valeurs sont étudiées après correction, afin de prendre en compte la dilution et les erreurs de lecture de l'absorbance.

Composés	logK	Stœchiométrie de liaison
FQ	5,52 ± 0,06	1 : 1
FQ-Me	4,71 ± 0,05	1 : 1
RQ	4,44 ± 0,16 et 4,47 ± 0,06	1 : 2
RQ-Me	4,59 ± 0,02	1 : 1

Tableau 20 : Constantes d'affinité déterminées entre l'hématine et les différents composés dans une solution aqueuse de DMSO à 40% (pH 7.5) à 25 °C

Comme pour la FQ, tous les composés forment des complexes avec l'hématine en solution. Dans les conditions expérimentales reproduisant le milieu vacuolaire, une molécule de FQ-Me (ou RQ-Me) s'associe avec une molécule d'hématine selon une stoechiométrie 1:1, avec une constante d'affinité du même ordre de grandeur (*Figure 70*). Les modifications chimiques ont donc peu d'influence sur l'interaction non covalente entre l'hématine et ces molécules. Fait intéressant, nous avons trouvé une constante de liaison plus grande pour la FQ que celle déterminée précédemment.(68) Cette valeur est exactement la même que celle déterminée pour la CQ. En fait, la valeur de logK de la FQ diminue avec le temps, ce qui suggère que la FQ est modifiée en solution au cours d'une période de quelques heures. Ces changements pourraient être le résultat soit d'agrégation soit de l'oxydation de la FQ. Cette dernière hypothèse est conforme à nos observations récentes. En effet, nous avons postulé que le comportement rédox de la FQ pourrait être responsable de la destruction du complexe hématine-drogue par une réaction de type Fenton.

Dans le cas de la FQ-Me et de la RQ-Me, les valeurs de logK sont inférieures à celles déterminées pour la FQ, mais restent néanmoins du même ordre de grandeur. Il semblerait donc que la présence du groupe méthyle modifierait la spécificité et la géométrie de l'interaction entre les composés et l'hématine, conduisant à une diminution des constantes d'association. Il a été suggéré que le processus de biocrystallisation de l'hématine en hémazoïne est un processus dépendant du pH, et que l'ajout de CQ pourrait altérer cet équilibre.(69) L'ajout d'un groupement méthyle sur l'atome N11 de la FQ engendre une augmentation de la valeur du pKa donc une augmentation de la basicité en milieu aqueux. La variation de pH ainsi engendrée pourrait avoir des conséquences sur la formation de l'hémazoïne et de ses précurseurs et ainsi engendrer une diminution de la capacité de la FQ-Me

à interagir avec ceux-ci. D'autre part, une étude récente(70) suggèrent que les médicaments quinoléiques n'agirait pas de manière semblable dans les mécanismes d'inhibition de la croissance ou de la nucléation de l'hémozoïne. En effet, il a été montré que la CQ inhiberait la croissance de l'hémozoïne en prévenant la conversion du dimère μ -oxo en hémozoïne alors que la CQ agirait en empêchant la conversion du monomère de FPIX en dimère μ -oxo, l'AQ agirait à ces deux niveaux. Ces résultats montrent clairement que malgré une structure et un mécanisme d'action proches, les médicaments quinoléiques agissent à des niveaux différents dans le processus d'inhibition de la formation de l'hémozoïne. L'ajout d'un groupement méthyle sur l'atome N11 pourrait engendrer une modification de l'interaction de la molécule avec le processus d'inhibition de croissance du pigment malarique.

En ce qui concerne la RQ, l'analyse des données est plus compliquée. En effet, trois modèles différents d'interaction ont été envisagés : selon une stœchiométrie 1:1, selon une stœchiométrie 2:1 classique ou selon une stœchiométrie 2:1 coopérative. L'analyse des données nous a permis de conclure que la RQ devrait se lier à l'hématine selon le modèle 2:1 classique avec deux valeurs de $\log K$ très proches. Les constantes d'association sont également plus faibles que celles obtenues pour la FQ. Cette différence pourrait être expliquée par la plus grande taille de l'atome de ruthénium par rapport à l'atome de fer. En effet, le volume moléculaire de la RQ ($350 \text{ cm}^3 / \text{mol}$) par rapport à celui de la FQ ($280 \text{ cm}^3 / \text{mol}$). Toutefois, il reste difficile d'expliquer pourquoi un tel phénomène n'est pas observé avec la RQ-Me qui forme un complexe 1:1 avec l'hématine, comme observé avec la FQ et la FQ-Me. Ces données suggèrent que d'autres facteurs sont impliqués dans leur activité antipaludique.

III.5.2. Site de liaison proposé pour la FQ sur les faces du cristal d'hémozoïne

L'inhibition de la nucléation et / ou de la croissance des cristaux d'hémozoïne induite par la FQ peuvent être expliquées par la liaison stéréosélective de la FQ sur les faces de ceux-ci. Cette étude a été réalisée en collaboration avec le Pr Leslie Leiserowitz (Weizmann Institute of Science, Israël). Généralement, les deux formes biogénique (hémozoïne) et synthétique (β -hématine) du pigment malarique présentent les trois faces dominantes d'un cristal : { h, k, l } les faces latérales {100} et {010}, qui sont perpendiculairement l'une de l'autre, et la face {011} qui est inclinée par rapport à l'axe c , terminant le cristal à chaque extrémité.(71) Parfois, les cristaux d'hémozoïne biogénique possèdent une face {001}, qui est perpendiculaire à l'axe c et qui n'est pas correctement développée. La face {001} expose le fragment acide propionique $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$, le groupe propionate $\text{O}=\text{C}-\text{O}-\text{Fe}$, les groupes C-H

du cycle périphérique et une partie du noyau plan de l'hème. La face {100} expose l'acide propionique $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ et les groupes C-H du cycle périphérique avec un angle oblique, tandis que la face latérale {010} expose le noyau plan de l'hème.

Pour retarder la nucléation et / ou la croissance de l'hémozoïne, il a été suggéré qu'un médicament antipaludique doit se lier à au moins l'une des faces {001} ou {011}. Un inhibiteur efficace de la nucléation et / ou de la croissance des cristaux d'hémozoïne devrait également se lier soit à la face {100} ou à la face {010}. Comme vu précédemment, il avait été proposé que le mécanisme d'action de la CQ impliquerait la liaison de celle-ci aux faces {001} et {100}.(72)

Afin de fixer la conformation de la FQ de sorte qu'elle puisse être adsorbée sur les faces {001} et {100}, la conformation de la FQ a été ajustée sur le modèle de la CQ. L'énergie de conformation de la FQ a ensuite été minimisée par un champ de force COMPASS. Seule la FQ est "flexible", le cristal d'hémozoïne reste fixe. Les conformations des fragments d'acide propionique, vinyle et méthyle du cristal hôte, exposées aux faces {001} et {100}, ont ensuite été ajustées manuellement pour satisfaire au mieux aux liaisons hydrogènes acides-bases N-H...O et C-H...X (O ou N) entre l'adsorbat et la surface du cristal.

Il existe deux possibilités d'association de la FQ avec la β -hématine, comme dans le cas de la CQ. La première possibilité consiste en une interaction de type π - π entre le cycle quinoléine et la porphyrine, associée à une liaison hydrogène entre l'azote protoné terminal de la chaîne latérale de la FQ et le groupe propionate (*Figure 71*).

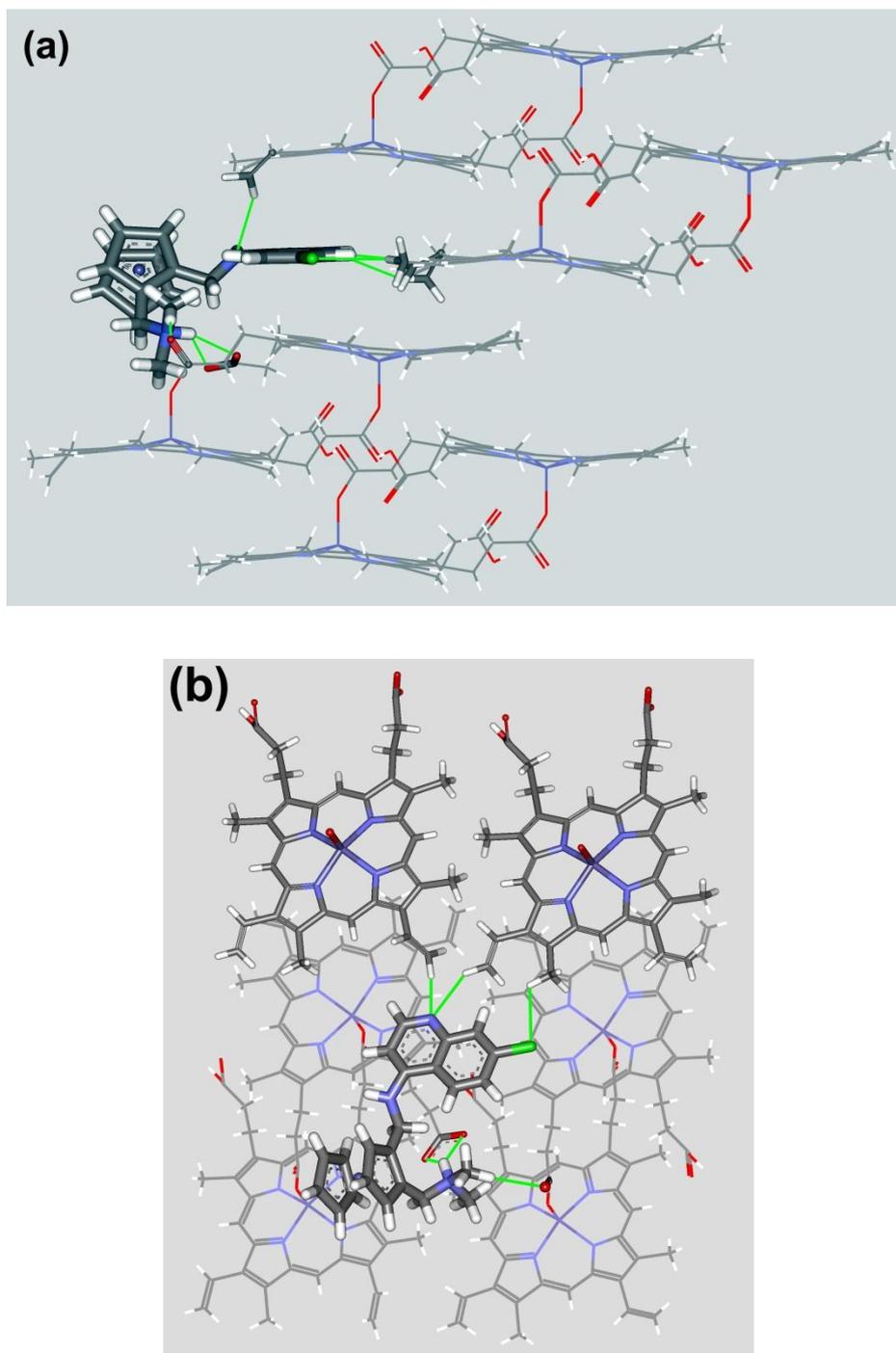


Figure 71 : Prédiction des interactions de liaison de la FQ sur la face {00-1} du cristal d'hémozoïne, par mécanique moléculaire.

La seconde possibilité consiste en deux liaisons hydrogènes : d'une part, entre l'azote protoné du cycle quinoléine et un groupement propionate, et, d'autre part, avec l'azote protoné terminale de la chaîne latérale de la FQ (Figure 72). Ces deux possibilités ne sont possibles que dans le cas où il y a eu transfert de protons entre l'acide propionique du cristal et les azotes basiques de la FQ.

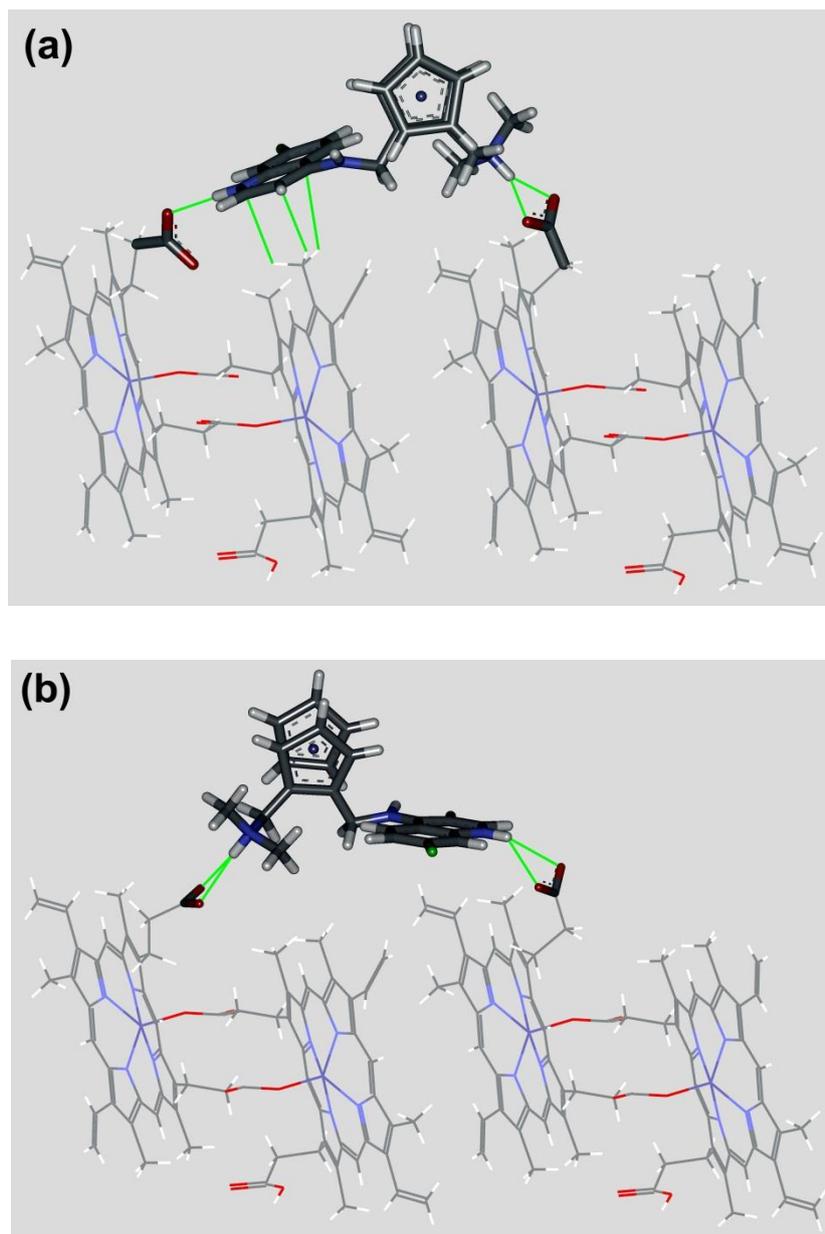


Figure 72 : Prédications par mécanique moléculaire des contacts intermoléculaires existants entre la FQ et la face $\{1,0,0\}$ du cristal d'hémozoïne.

D'autre part, comme dans le cas de la CQ(72), les formes d'interaction de la FQ devraient être mono- ou diprotonées, car on peut s'attendre à un transfert de protons de la part d'un (ou de deux) acide(s) propionique(s) du cristal de β -hématine vers les groupes aminés basiques de la FQ. La plus forte proportion de formes neutres et monoprotionées de la FQ par rapport à la CQ pourrait expliquer la plus grande efficacité de la FQ pour lier le cristal de β -hématine. Des résultats similaires ont été observés pour la RQ.

II.6. Conclusion

La synthèse et l'analyse des analogues de la FQ, nous ont permis d'améliorer nos connaissances dans les mécanismes d'action de cette molécule, notamment sur sa localisation dans le site d'action.

Nous avons montré qu'au pH cytosolique, la FQ et la RQ sont sous leur forme « fermée », grâce à la formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire, et devraient posséder une meilleure perméabilité membranaire que les formes « ouvertes » de la FQ-Me et de la RQ-Me. D'autre part, il existe une balance entre les formes neutres de la FQ et de la RQ vers les formes diprotonées de FQ•2HCl et RQ•2HCl grâce à une énergie de liaison hydrogène intramoléculaire relativement faible. Ces données suggèrent que la FQ et la RQ pourraient aisément traverser la membrane de la vacuole digestive, où le pH acide de 5,2 permettrait la formation préférentielle de la forme ouverte diprotonée qui ne serait plus capable de traverser à nouveau la membrane, réduisant ainsi l'efflux.

Une corrélation positive significative des valeurs de CI_{50} entre la FQ et la RQ, entre la FQ et la RQ-Me, entre la FQ-Me et la CQ, et entre la RQ et la RQ-Me, suggèrent que la FQ et la RQ posséderait le même type de mécanisme d'action. La FQ-Me et la CQ pourraient posséder le même mécanisme de résistance, de plus elles seraient probablement expulsées par les mêmes protéines de transport. D'autre part, les activités antipaludiques de la FQ et de la RQ ne sont pas corrélées avec les polymorphismes des gènes *pfcr*, *PfMRP*, *pfmdr1*, ou *pfmhe-1*. Le comportement pharmacologique de la FQ serait donc fortement modifié par la présence du noyau ferrocénique, ce qui pourrait jouer un rôle fondamental dans le mécanisme d'action moléculaire de la FQ.

La RQ (et donc la FQ) s'accumule préférentiellement dans les hématies parasitées par rapport aux hématies saines. D'autre part, nous avons montré que l'accumulation de la RQ dans les hématies parasitées atteint très vite un équilibre ce qui suppose une grande rapidité d'action de la RQ (et de la FQ). D'autre part, l'absence de la liaison hydrogène intramoléculaire engendre une diminution de la cinétique d'accumulation, suggérant que cette liaison est essentielle à une accumulation rapide et efficace de la RQ, donc de la FQ, à l'intérieur du compartiment vacuolaire.

Des expériences de microscopie électronique nous ont permis de montrer, sans coloration, que la RQ s'accumulerait dans les membranes de la vacuole digestive à proximité

du pigment malarique. D'autre part, la localisation de la RQ, de la FQ et de la CQ a été réalisée et nous a permis de mettre en évidence une différence importante dans la localisation entre la FQ (et la RQ) et la CQ. La RQ et la FQ s'accumulent préférentiellement dans la vacuole digestive du parasite. Dans les souches CQ-sensibles, la CQ est présente de façon diffuse à l'intérieur du parasite alors qu'elle est absente (ou non détectée) de la vacuole digestive dans les souches CQ-résistantes. Ces données suggèrent que la FQ agirait au niveau de la vacuole digestive où elle inhiberait la croissance du pigment malarique. Des études de modélisation des interactions de la FQ avec l'hémozoïne a permis de montrer que la FQ pourrait se lier aux faces $\{0,0,1\}$ et $\{1,0,0\}$ du cristal de β -hématine.

Dans les conditions oxydantes de la vacuole digestive, nous avons montré que la FQ et la FQ-Me sont capables de générer la production de radicaux HO° par des réactions de type Fenton. Les deux molécules produiraient la même quantité de radicaux HO° , suggérant que l'introduction d'un groupement méthyl sur l'azote N11 ne modifierait pas les propriétés rédox de la molécule. La plus faible activité de la FQ-Me serait due à une moins bonne accumulation dans la vacuole digestive. De plus, nous avons montré que contrairement à la CQ, la FQ engendre une augmentation des mécanismes rédox à l'intérieur du parasite, notamment une augmentation de la production des radicaux HO° dans la vacuole digestive. D'autre part, en présence de FQ, l'ultrastructure du parasite est modifiée. En effet, la présence de FQ engendre la disparition partielle ou totale de la membrane de la vacuole digestive ainsi qu'une diminution de la taille des cristaux d'hémozoïne. Dans les mêmes conditions, les dommages engendrés par la FQ-Me sont plus faibles, démontrant que la capacité de la FQ à s'accumuler dans la vacuole digestive permet une meilleure efficacité de son mécanisme d'action.

Ces résultats montrent donc que la FQ possède un mécanisme d'action multifactoriel. La FQ s'accumule dans la vacuole digestive du parasite grâce à une amélioration du transport membranaire engendrée par son caractère lipophile, mais aussi par la présence d'une liaison hydrogène intramoléculaire obtenue grâce à une balance subtile entre les formes neutres, monoprotées et diprotées. En plus de son efficacité d'inhibition de la croissance du pigment malarique, les propriétés rédox de la FQ semblent engendrer de graves dommages au parasite, notamment à la membrane du compartiment vacuolaire, ce qui pourrait précipiter la lyse rapide du parasite. De plus, la structure particulière de la FQ, lui permettrait d'échapper aux protéines de transports impliquées dans la résistance aux quinoléines, lui permettant ainsi

d'être un bon candidat médicament. La FQ est donc un candidat médicament possédant un mécanisme d'action original et distinct de celui de la CQ.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Chavain, N., Vezin, H., Dive, D., Touati, N., Paul, J. F., Buisine, E., et Biot, C. (2008) Investigation of the redox behavior of ferroquine, a new antimalarial, *Mol Pharm* 5, 710-6.
2. Biot, C., Chavain, N., Dubar, F., Pradines, B., Trivelli, X., Brocard, J., Forfar, I., et Dive, D. (2009) Structure–activity relationships of 4-N-substituted ferroquine analogues: Time to re-evaluate the mechanism of action of ferroquine, *J. Organomet. Chem.* 694, 845-854.
3. Dubar, F., Khalife, J., Brocard, J., Dive, D., et Biot, C. (2008) Ferroquine, an ingenious antimalarial drug: thoughts on the mechanism of action, *Molecules* 13, 2900-7.
4. Pigeon, P., Top, S., Vessieres, A., Huche, M., Hillard, E. A., Salomon, E., et Jaouen, G. (2005) Selective estrogen receptor modulators in the ruthenocene series. Synthesis and biological behavior, *J Med Chem* 48, 2814-21.
5. Dubar, F., Egan, T. J., Pradines, B., Kuter, D., Ncokazi, K. K., Forge, D., Paul, J.-F., Pierrot, C., Kalamou, H., Khalife, J., Buisine, E., Rogier, C., Vezin, H., Forfar, I., Slomianny, C., Trivelli, X., Kapishnikov, S., Leiserowitz, L., Dive, D., et Biot, C. (2011) The Antimalarial Ferroquine: Role of the Metal and Intramolecular Hydrogen Bond in Activity and Resistance, *ACS Chemical Biology* 6, 275-287.
6. Ashwood, V. A., Field, M. J., Horwell, D. C., Julien-Larose, C., Lewthwaite, R. A., McCleary, S., Pritchard, M. C., Raphy, J., et Singh, L. (2001) Utilization of an intramolecular hydrogen bond to increase the CNS penetration of an NK(1) receptor antagonist, *J Med Chem* 44, 2276-85.
7. Rezai, T., Bock, J. E., Zhou, M. V., Kalyanaraman, C., Lokey, R. S., et Jacobson, M. P. (2006) Conformational flexibility, internal hydrogen bonding, and passive membrane permeability: successful in silico prediction of the relative permeabilities of cyclic peptides, *J Am Chem Soc* 128, 14073-80.
8. Kuhn, B., Mohr, P., et Stahl, M. (2010) Intramolecular Hydrogen Bonding in Medicinal Chemistry, *Journal of medicinal chemistry* 53, 2601-2611.
9. Becker, K., Tilley, L., Vennerstrom, J. L., Roberts, D., Rogerson, S., et Ginsburg, H. (2004) Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions, *Int J Parasitol* 34, 163-89.
10. Kannan, R., Kumar, K., Sahal, D., Kukreti, S., et Chauhan, V. S. (2005) Reaction of artemisinin with haemoglobin: implications for antimalarial activity, *Biochem J* 385, 409-18.
11. Becke, A. D. (1993) Density functional thermochemistry. III. The role of exact exchange, *J. Chem. Phys.* 98, 5648–5652.

12. Lee, C., White, D., Suits, B. H., Bancel, P. A., et Heiney, P. A. (1988) NMR study of Li in Al-Li-Cu icosahedral alloys, *Phys Rev B Condens Matter* 37, 9053-9056.
13. Schäfer, A., Huber, C., et Ahlrichs, R. J. (1994) Fully optimized contracted Gaussian basis sets of triple zeta valence quality for atoms Li to Kr, *J. Chem. Phys.* 100, 5829-5835.
14. Hill, M. G., Lamanna, W. M., et Mann, K. R. (1991) Tetrabutylammonium tetrakis[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]borate as a noncoordinating electrolyte: reversible 1e- oxidations of ruthenocene, osmocene, and Rh₂(TM₄)₄²⁺ (TM₄=2,5-diisocyano-2,5-dimethylhexane), *Inorganic Chemistry* 30, 4687-4690.
15. Swarts, J. C., Nafady, A., Roudebush, J. H., Trupia, S., et Geiger, W. E. (2009) One-Electron Oxidation of Ruthenocene: Reactions of the Ruthenocenium Ion in Gentle Electrolyte Media, *Inorganic chemistry* 48, 2156-2165.
16. Henry, M., Alibert, S., Orlandi-Pradines, E., Bogreau, H., Fusai, T., Rogier, C., Barbe, J., et Pradines, B. (2006) Chloroquine resistance reversal agents as promising antimalarial drugs, *Curr Drug Targets* 7, 935-48.
17. Saliba, K. J., Lehane, A. M., et Kirk, K. (2008) A polymorphic drug pump in the malaria parasite, *Mol Microbiol* 70, 775-9.
18. Pradines, B., Pages, J. M., et Barbe, J. (2005) Chemosensitizers in drug transport mechanisms involved in protozoan resistance, *Curr Drug Targets Infect Disord* 5, 411-31.
19. Pradines, B. (2009) ABC proteins involved in protozoan parasites resistance. In *ABC Transporters and Multidrug Resistance*, p 195-238, Wiley & Sons Inc.
20. Pradines, B., Parquet, V., et Orlandi-Pradines, E. (2009) ABC Transporters in Plasmodium falciparum and their involvement in resistance to antimalarial drugs. In *ABC transporters in microorganisms*, p 113-127, Horizon Scientific Press.
21. Pradines, B., Pistone, T., Ezzedine, K., Briolant, S., Bertaux, L., Receveur, M. C., Parzy, D., Millet, P., Rogier, C., et Malvy, D. (2010) Quinine-resistant malaria in traveler returning from Senegal, 2007, *Emerg Infect Dis* 16, 546-8.
22. Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J Immunol Methods* 65, 55-63.
23. Biot, C., Daher, W., Ndiaye, C. M., Melnyk, P., Pradines, B., Chavain, N., Pellet, A., Fraisse, L., Pelinski, L., Jarry, C., Brocard, J., Khalife, J., Forfar-Bares, I., et Dive, D. (2006) Probing the role of the covalent linkage of ferrocene into a chloroquine template, *J Med Chem* 49, 4707-14.
24. Ortega, R., Cloetens, P., Devès, G., Carmona, A., et Bohic, S. (2007) Iron storage within dopamine neurovesicles revealed by chemical nano-imaging, *PLoS ONE* 2, e925.

25. Lewis, D. J., Bruce, C., Bohic, S., Cloetens, P., Hammond, S. P., Arbon, D., Blair-Reid, S., Pikramenou, Z., et Kysela, B. (2010) Intracellular synchrotron nanoimaging and DNA damage/genotoxicity screening of novel lanthanide-coated nanovectors, *Nanomedicine (Lond)* 5, 1547-1557.
26. Sullivan, D. J., Gluzman, I. Y., Russell, D. G., et Goldberg, D. E. (1996) On the molecular mechanism of chloroquine's antimalarial action, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11865-70.
27. Krogstad, D. J., Gluzman, I. Y., Kyle, D. E., Oduola, A. M., Martin, S. K., Milhous, W. K., et Schlesinger, P. H. (1987) Efflux of chloroquine from Plasmodium falciparum: mechanism of chloroquine resistance, *Science* 238, 1283-5.
28. Ginsburg, H., Famin, O., Zhang, J., et Krugliak, M. (1998) Inhibition of glutathione-dependent degradation of heme by chloroquine and amodiaquine as a possible basis for their antimalarial mode of action, *Biochem. Pharmacol.* 56, 1305-1313.
29. Meister, A., et Anderson, M. E. (1983) Glutathione, *Annu. Rev. Biochem.* 52, 711-760.
30. Kehr, S., Sturm, N., Rahlfs, S., Przyborski, J. M., et Becker, K. (2010) Compartmentation of redox metabolism in malaria parasites, *PLoS Pathog* 6, e1001242.
31. Meierjohann, S., Walter, R. D., et Müller, S. (2002) Regulation of intracellular glutathione levels in erythrocytes infected with chloroquine-sensitive and chloroquine-resistant Plasmodium falciparum, *Biochem. J.* 368, 761-768.
32. Chandra, R., Tripathi, L. M., Saxena, J. K., et Puri, S. K. (2011) Implication of intracellular glutathione and its related enzymes on resistance of malaria parasites to the antimalarial drug arteether, *Parasitology International* 60, 97-100.
33. Atamna, H., et Ginsburg, H. (1995) Heme degradation in the presence of glutathione. A proposed mechanism to account for the high levels of non-heme iron found in the membranes of hemoglobinopathic red blood cells, *J. Biol. Chem.* 270, 24876-24883.
34. Ittarat, W., Sreepian, A., Srisarin, A., et Pathepchotivong, K. (2003) Effect of dihydroartemisinin on the antioxidant capacity of P. falciparum-infected erythrocytes, *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 34, 744-750.
35. Dubois, V. L., Platel, D. F., Pauly, G., et Tribouley-Duret, J. (1995) Plasmodium berghei: implication of intracellular glutathione and its related enzyme in chloroquine resistance in vivo, *Exp. Parasitol.* 81, 117-124.
36. He, Z., Chen, L., You, J., Qin, L., et Chen, X. (2009) Antiretroviral protease inhibitors potentiate chloroquine antimalarial activity in malaria parasites by regulating intracellular glutathione metabolism, *Exp. Parasitol.* 123, 122-127.
37. Wunsch, S., Sanchez, C. P., Gekle, M., Grosse-Wortmann, L., Wiesner, J., et Lanzer, M. (1998) Differential stimulation of the Na⁺/H⁺ exchanger determines chloroquine uptake in Plasmodium falciparum, *J Cell Biol* 140, 335-45.

38. Wickham, M. E., Rug, M., Ralph, S. A., Klonis, N., McFadden, G. I., Tilley, L., et Cowman, A. F. (2001) Trafficking and assembly of the cytoadherence complex in Plasmodium falciparum-infected human erythrocytes, *EMBO J.* 20, 5636-5649.
39. Dzekunov, S. M., Ursos, L. M., et Roepe, P. D. (2000) Digestive vacuolar pH of intact intraerythrocytic P. falciparum either sensitive or resistant to chloroquine, *Mol. Biochem. Parasitol.* 110, 107-124.
40. Hayashi, M., Yamada, H., Mitamura, T., Horii, T., Yamamoto, A., et Moriyama, Y. (2000) Vacuolar H(+)-ATPase localized in plasma membranes of malaria parasite cells, Plasmodium falciparum, is involved in regional acidification of parasitized erythrocytes, *J. Biol. Chem.* 275, 34353-34358.
41. Wünsch, S., Horrocks, P., Gekle, M., et Lanzer, M. (1999) Single-cell measurements of ion concentrations within the intracellular parasite, *Parasitol. Today (Regul. Ed.)* 15, 198-200.
42. Rohrbach, P. (2012) Quantitative fluorescent live cell imaging of intracellular Ca²⁺ and H⁺ ions in malaria parasites, *Meth. Enzymol.* 505, 469-483.
43. Ginsburg, H. (2000) On the use of single-cell fluorescence imaging for the measurement of intracellular ion concentrations, *Parasitol. Today (Regul. Ed.)* 16, 40-41.
44. Wissing, F. (2002) Illumination of the Malaria Parasite Plasmodium falciparum Alters Intracellular pH. IMPLICATIONS FOR LIVE CELL IMAGING, *Journal of Biological Chemistry* 277, 37747-37755.
45. Fidock, D. A., Nomura, T., Talley, A. K., Cooper, R. A., Dzekunov, S. M., Ferdig, M. T., Ursos, L. M., Sidhu, A. B., Naudé, B., Deitsch, K. W., Su, X. Z., Wootton, J. C., Roepe, P. D., et Wellems, T. E. (2000) Mutations in the P. falciparum digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance, *Mol. Cell* 6, 861-871.
46. Bray, P. G., Janneh, O., Raynes, K. J., Mungthin, M., Ginsburg, H., et Ward, S. A. (1999) Cellular uptake of chloroquine is dependent on binding to ferriprotoporphyrin IX and is independent of NHE activity in Plasmodium falciparum, *J Cell Biol* 145, 363-76.
47. Bray, P. G., Ward, S. A., et Ginsburg, H. (1999) Na⁺/H⁺ antiporter, chloroquine uptake and drug resistance: inconsistencies in a newly proposed model, *Parasitol. Today (Regul. Ed.)* 15, 360-363.
48. Martiney, J. A., Ferrer, A. S., Cerami, A., Dzekunov, S., et Roepe, P. (1999) Chloroquine uptake, altered partitioning and the basis of drug resistance: evidence for chloride-dependent ionic regulation, *Novartis Found. Symp.* 226, 265-277; discussion 277-280.

49. Li, P., Xie, T., Duan, X., Yu, F., Wang, X., et Tang, B. (2010) A new highly selective and sensitive assay for fluorescence imaging of $\cdot\text{OH}$ in living cells: effectively avoiding the interference of peroxynitrite, *Chemistry* 16, 1834-1840.
50. Koide, Y., Urano, Y., Kenmoku, S., Kojima, H., et Nagano, T. (2007) Design and synthesis of fluorescent probes for selective detection of highly reactive oxygen species in mitochondria of living cells, *J. Am. Chem. Soc.* 129, 10324-10325.
51. Kundu, K., Knight, S. F., Willett, N., Lee, S., Taylor, W. R., et Murthy, N. (2009) Hydrocyanines: a class of fluorescent sensors that can image reactive oxygen species in cell culture, tissue, and in vivo, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48, 299-303.
52. Oushiki, D., Kojima, H., Terai, T., Arita, M., Hanaoka, K., Urano, Y., et Nagano, T. (2010) Development and application of a near-infrared fluorescence probe for oxidative stress based on differential reactivity of linked cyanine dyes, *J. Am. Chem. Soc.* 132, 2795-2801.
53. Maeda, H., Yamamoto, K., Kohno, I., Hafsi, L., Itoh, N., Nakagawa, S., Kanagawa, N., Suzuki, K., et Uno, T. (2007) Design of a practical fluorescent probe for superoxide based on protection-deprotection chemistry of fluoresceins with benzenesulfonyl protecting groups, *Chemistry* 13, 1946-1954.
54. Louit, G. (2005) Développement de sondes fluorescentes du radical hydroxyle : caractérisation et modélisation de la réactivité de molécules dérivées de la coumarine avec $\text{HO}\cdot$, Université Paris 11, Orsay.
55. Hirosawa, S., Arai, S., et Takeoka, S. (2012) A TEMPO-conjugated fluorescent probe for monitoring mitochondrial redox reactions, *Chem. Commun. (Camb.)* 48, 4845-4847.
56. Oliveira, E., Capelo, J. L., Lima, J. C., et Lodeiro, C. (2012) Novel emissive bio-inspired non-proteinogenic coumarin-alanine amino acid: fluorescent probe for polyfunctional systems, *Amino acids*.
57. Reddie, K. G., Humphries, W. H., Bain, C. P., Payne, C. K., Kemp, M. L., et Murthy, N. (2012) Fluorescent coumarin thiols measure biological redox couples, *Org. Lett.* 14, 680-683.
58. Yuan, L., Lin, W., et Song, J. (2010) Ratiometric fluorescent detection of intracellular hydroxyl radicals based on a hybrid coumarin-cyanine platform, *Chemical Communications* 46, 7930.
59. Kiyose, K., Kojima, H., et Nagano, T. (2008) Functional Near-Infrared Fluorescent Probes, *Chemistry - An Asian Journal* 3, 506-515.
60. Zhang, Z., Berezin, M. Y., Kao, J. L. F., d' Avignon, A., Bai, M., et Achilefu, S. (2008) Near-infrared dichromic fluorescent carbocyanine molecules, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 47, 3584-3587.

61. Richard, J.-A., Massonneau, M., Renard, P.-Y., et Romieu, A. (2008) 7-hydroxycoumarin-hemicyanine hybrids: a new class of far-red emitting fluorogenic dyes, *Org. Lett.* *10*, 4175-4178.
62. Wu, J.-S., Liu, W.-M., Zhuang, X.-Q., Wang, F., Wang, P.-F., Tao, S.-L., Zhang, X.-H., Wu, S.-K., et Lee, S.-T. (2007) Fluorescence Turn On of Coumarin Derivatives by Metal Cations: A New Signaling Mechanism Based on C=N Isomerization, *Organic Letters* *9*, 33-36.
63. Atamna, H., et Ginsburg, H. (1993) Origin of reactive oxygen species in erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*, *Mol. Biochem. Parasitol* *61*, 231-241.
64. Playfair, J. H., Dockrell, H., et Taverne, J. (1985) Macrophages as effector cells in immunity to malaria, *Immunol. Lett.* *11*, 233-237.
65. Ribaut, C. (2008) Elaboration d'un biocapteur cellulaire impédancemétrique pour la mesure des changements physiologiques affectant la cellule parasitée, Université de Toulouse III - Paul Sabatier, Toulouse.
66. Lehane, A. M., McDevitt, C. A., Kirk, K., et Fidock, D. A. (2012) Degrees of chloroquine resistance in *Plasmodium* – Is the redox system involved?, *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* *2*, 47-57.
67. Miyachi, Y., Yoshioka, A., Imamura, S., et Niwa, Y. (1986) Antioxidant action of antimalarials, *Ann. Rheum. Dis.* *45*, 244-248.
68. Biot, C., Taramelli, D., Forfar-Bares, I., Maciejewski, L. A., Boyce, M., Nowogrocki, G., Brocard, J. S., Basilico, N., Olliaro, P., et Egan, T. J. (2005) Insights into the mechanism of action of ferroquine. Relationship between physicochemical properties and antiplasmodial activity, *Mol Pharm* *2*, 185-93.
69. Casabianca, L. B., An, D., Natarajan, J. K., Alumasa, J. N., Roepe, P. D., Wolf, C., et de Dios, A. C. (2008) Quinine and chloroquine differentially perturb heme monomer-dimer equilibrium, *Inorg Chem* *47*, 6077-6081.
70. Alumasa, J. N., Gorka, A. P., Casabianca, L. B., Comstock, E., de Dios, A. C., et Roepe, P. D. (2011) The hydroxyl functionality and a rigid proximal N are required for forming a novel non-covalent quinine-heme complex, *Journal of Inorganic Biochemistry* *105*, 467-475.
71. Buller, R., Pereson, M. L., Almarsson, O., et Leiserowitz, L. (2002) Quinoline Binding Site on Malaria Pigment Crystal: A Rational Pathway for Antimalaria Drug Design, *Cryst. Growth Des.* *2*, 553-562.
72. Weissbuch, I., et Leiserowitz, L. (2008) Interplay Between Malaria, Crystalline Hemozoin Formation, and Antimalarial Drug Action and Design, *Chemical reviews* *108*, 4899-4914.

CHAPITRE III

COMPREHENSION DU MECANISME D'ACTION D'ANALOGUES DE LA CIPROFLOXACINE

I. Introduction

Comme nous l'avons vu précédemment, l'apicoplaste présent chez *Plasmodium spp* est une cible potentielle dans le développement de nouveaux médicaments antipaludiques.⁽¹⁻³⁾ Il a été montré que les quinolones et les fluoroquinolones, qui ciblent les topoisomérases II et IV chez les bactéries,^(4, 5) sont également efficaces sur *P. falciparum*.⁽⁶⁾ La gyrase et la topoisomérase IV, dont la caractérisation biochimique a été résolue récemment, pourraient être les principales cibles des fluoroquinolones, telles que la ciprofloxacine.^(7, 8)

Récemment, nous avons reporté l'utilisation d'une double stratégie combinant une approche prodrogue à la chimie bioorganométallique, pour améliorer l'activité antipaludique d'un antibiotique, la ciprofloxacine (CIPRO).⁽⁹⁾ Cette stratégie a révélé que la démarche prodrogue permet d'engendrer une augmentation importante de l'activité antipaludique. D'une manière intéressante, l'ajout d'un groupement ferrocénique sur le noyau pipérazine, conduit à une amélioration supplémentaire de l'activité qui pourrait être partiellement attribuée à deux propriétés du métallocène. Tout d'abord, les propriétés rédox du Fc qui pourraient engendrer un stress oxydatif *in situ*.¹² Deuxièmement, la forte lipophilie du Fc qui pourrait permettre une amélioration du passage membranaires de ces analogues.¹³ Il est important de noter que ces deux mécanismes peuvent agir ensemble et ne sont pas exclusifs.

Nous avons souhaité explorer ces mécanismes d'action potentiels, c'est pourquoi nous avons synthétisé de nouveaux dérivés portant soit un groupement benzyle soit un groupement adamantanyle à la place du groupement ferrocényle. Ces substituants encombrants permettent de mimer le groupement ferrocénique tout en supprimant ses propriétés rédox. En effet, le groupement benzyle permet de conserver l'aromaticité de la molécule tandis que l'adamantane permet de conserver l'encombrement stérique.

Les nouvelles molécules ont été comparées à la CIPRO et à sa prodrogue ester éthylique. Nous avons étudié leurs stabilités ainsi que leurs activités antipaludiques, antitoxoplasmiques et leurs activités cytotoxiques. Nous avons ensuite entrepris la validation de la cible thérapeutique.

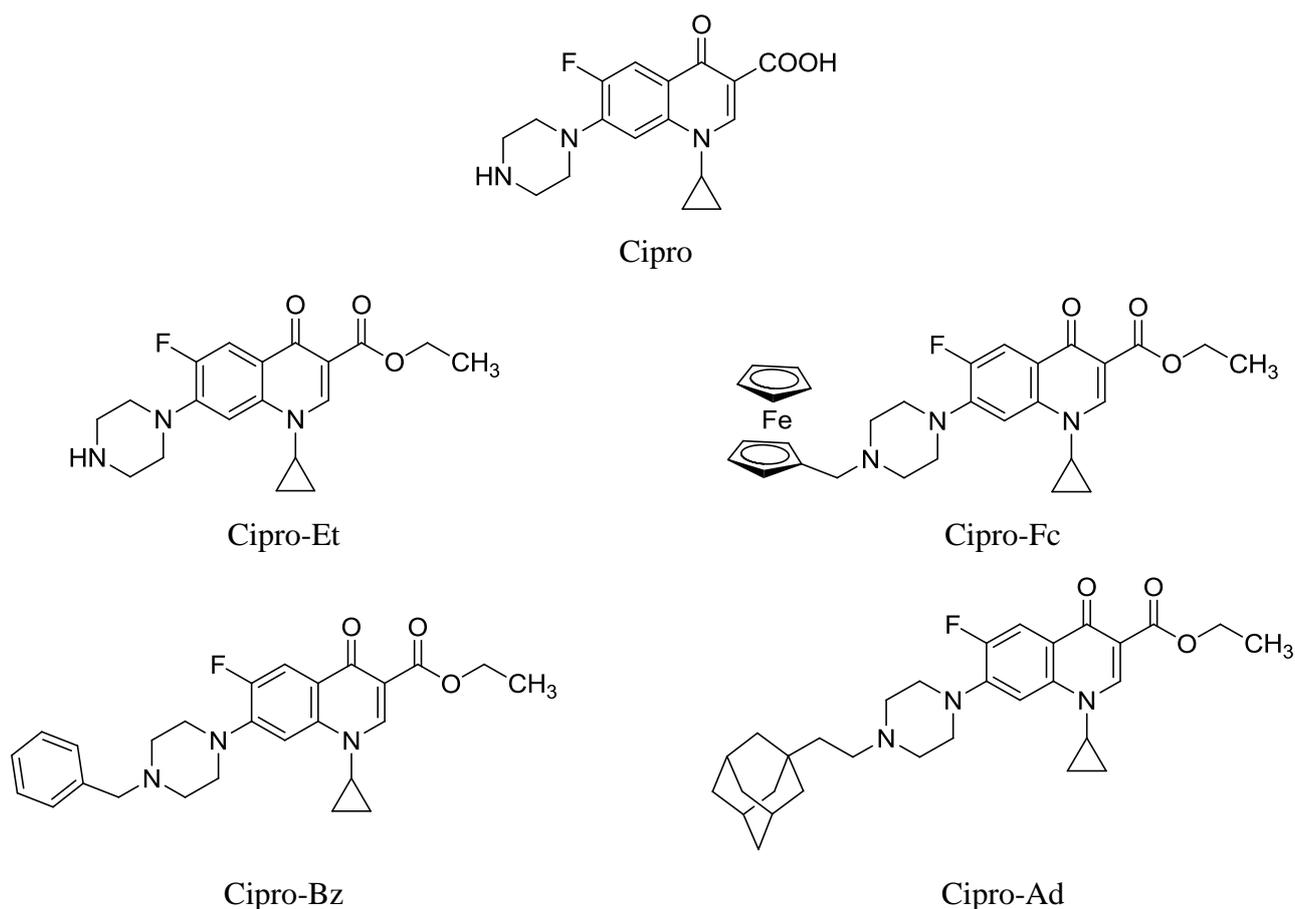


Figure 73 : Structures chimiques de la Ciprofloxacine (Cipro), de la prodrogue ester éthylique de la Ciprofloxacine (Cipro-Et), du dérivé ferrocénique de la Ciprofloxacine (Cipro-Fc), du dérivé benzylique de la Ciprofloxacine (Cipro-Bz) et du dérivé éthyladamantyle de la Ciprofloxacine (Cipro-Ad).

II. Fluoroquinolones organiques

II.1. Synthèse

L'acide 2,4,5-trifluorobenzoïque réagit avec le réactif de Vilsmeier-Haack (chlorure d'oxalyle et le diméthylformamide (DMF)) dans le dichlorométhane et permet d'obtenir avec un rendement quantitatif le chlorure d'acyle d'intérêt. Le chlorure d'acyle est ensuite condensé avec du 3-(diéthylamino)acrylate d'éthyle (fraîchement obtenu à partir de propionate d'éthyle et de *N,N*-diéthylamine) dans un mélange de toluène et de triéthylamine pour fournir le cétoester avec un rendement de 73%. La transaminolyse du cétoester avec la cyclopropylamine, puis la cyclisation du composé à l'aide de carbonate de potassium dans du DMF engendre la formation d'une difluoroquinolone. Les fluoroquinolones finales ont ensuite

été obtenues par couplage du composé précédent dans l'acétonitrile avec soit la 1-benzylpipérazine, avec un rendement de 64% ; soit avec la 1-{2-[(adamantan-1-yl)éthyl]pipérazine avec un rendement de 30%. La 1-{2-[(adamantan-1-yl)éthyl]pipérazine a été préparée à partir d'acide 2-(adamantan-1-yl)acétique en trois étapes: (i) la réduction de l'acide carboxylique en alcool primaire, (ii) la conversion de l'alcool en chlorure correspondant, et (iii) la condensation du chlorure avec la pipérazine.

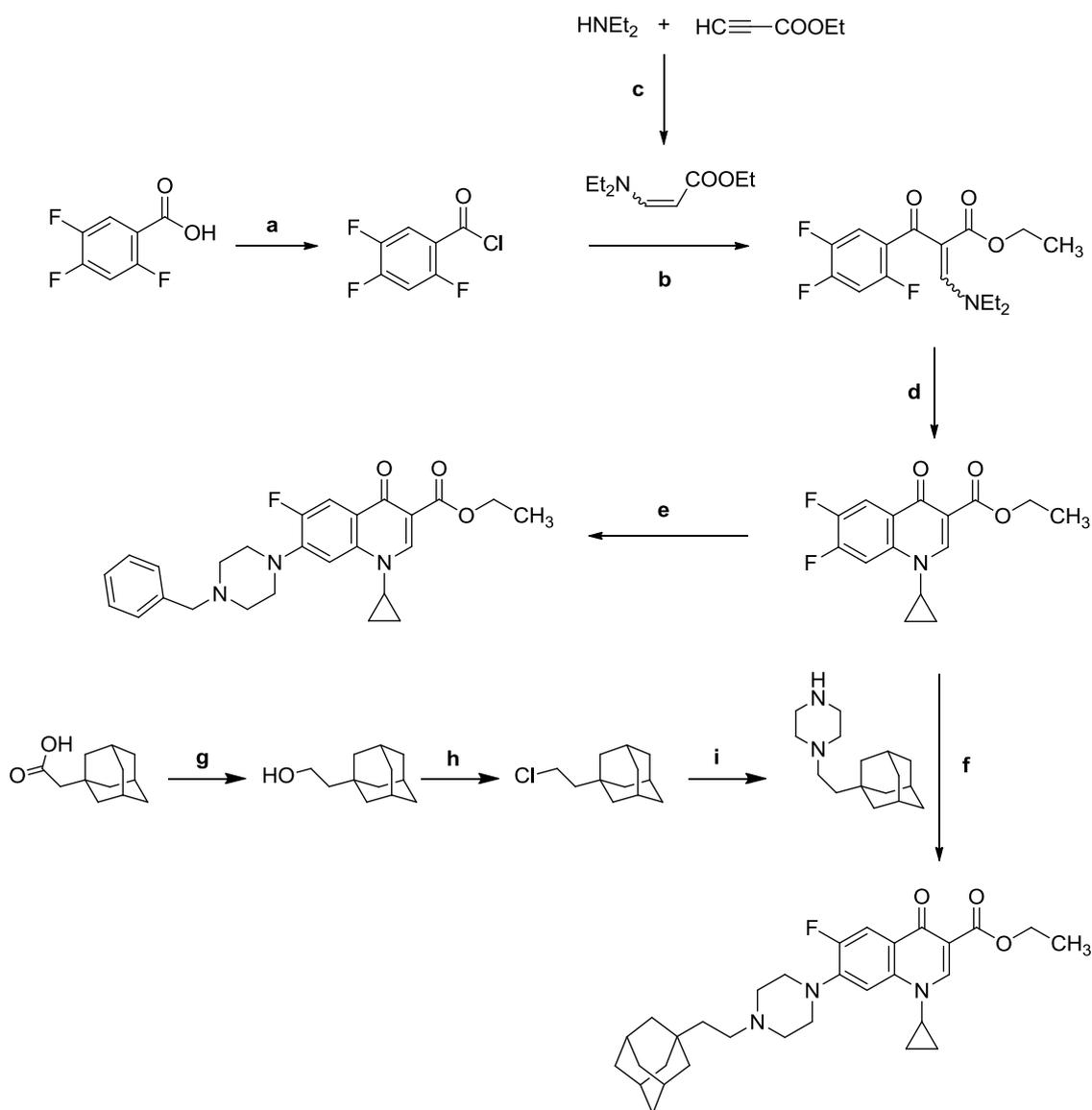


Figure 74 : Schéma de synthèse menant à la Cipro-Bz et à la Cipro-Ad.(a) $(\text{COCl})_2$, DMF, dichlorométhane, N_2 atm, Tamb., 24h; (b) toluène, Et_3N , N_2 , reflux, 24h, (c) CH_3CN , N_2 atm, Tamb., 24h (d) $\text{EtOH/Et}_2\text{O}$ (1/2), Tamb., 3h, puis DMF, K_2CO_3 , reflux, 12h; (e) benzylpipérazine, N_2 atm, CH_3CN , reflux; (f) N_2 atm, CH_3CN , reflux; (g) LiAlH_4 , N_2 atm, anh. THF, Tamb.; (h) SOCl_2 , pyridine; (i) pipérazine, K_2CO_3 , CH_3CN .

II.2. Etude de la stabilité des esters

Le recours à la stratégie prodrogue peut être utilisé à différentes fins. En effet, elle peut être utilisée afin d'augmenter la solubilité aqueuse d'une molécule destinée à être injectée, à améliorer l'absorption et la distribution du médicament, à augmenter la sélectivité de la molécule en lui permettant d'être activée au niveau de la cible, à améliorer sa stabilité métabolique ou chimique, à diminuer sa durée d'action en rendant la molécule moins sensible vis-à-vis des mécanismes d'activation, de réduire la toxicité du médicament, à augmenter l'acceptabilité en supprimant un mauvais goût ou une mauvaise odeur, ou encore pour permettre la reformulation d'une molécule.

Dans cette étude, la stratégie prodrogue a été appliquée pour tenter d'augmenter l'activité antipaludique des fluoroquinolones en améliorant le passage membranaire de nos molécules et ainsi permettre une accumulation au niveau de la cible. L'étude précédente avait montré que les analogues prodrogues de la Cipro étudiés précédemment, étaient plus actifs. Les nouveaux analogues ont été synthétisés afin d'étudier le mécanisme d'action de ces molécules, c'est pourquoi il a été nécessaire d'étudier la stabilité de ces prodrogues avant toute investigation supplémentaire.

II.2.1. Stabilité à pH physiologique

La stabilité de nos molécules (1mM) a été étudiée en milieu tamponné (tampon phosphate à pH 7,4) à 37°C durant 76 heures, par suivie HPLC.

Le suivi a été réalisé toutes les trente minutes jusqu'à deux heures puis toutes les heures. A partir de la sixième heure, le suivi a été réalisé toutes les deux heures. A partir de la vingtième heure, les prélèvements ont été réalisés toutes les quatre heures.

Toutes les molécules (Cipro-Et, Cipro-Bz, Cipro-Fc, et Cipro-Ad) se sont révélées très stables dans ces conditions. En effet, toutes les molécules sont stables durant plus de 76 heures et aucune dégradation n'a été observée. Dans le cas de la Cipro-Et, aucune libération de la Ciprofloxacine n'a été observée. Pour les autres molécules, les chromatogrammes sont restés identiques tout le long de nos expériences.

II.2.2. Stabilité en présence de sérum humain

Les molécules comportant certains groupes fonctionnels, tels que des esters, peuvent se décomposer dans la circulation sanguine, ce qui pourrait engendrer une grande clairance et un temps de demi-vie court. Une mauvaise stabilité plasmatique pourrait donc entraîner de mauvaises propriétés pharmacocinétiques *in vivo* et des performances pharmacologiques décevantes.

Le sang contient un grand nombre d'enzymes hydrolytiques, telles que les cholinestérases, les aldolases, les lipases, les déhydropeptidases et les phosphatases.(10) La proportion de chaque enzyme dépend de l'espèce, de l'état pathologique, du sexe, de l'âge et de la race.(11) Si le composé étudié présente une affinité pour les enzymes présentes dans le sang et qu'il possède un groupe hydrolysable dans la bonne position, alors il pourrait être décomposé dans le plasma. Nous avons donc étudié la stabilité de nos prodrogues dans du milieu de culture RPMI supplémenté par 10% de sérum humain à 37°C. Le suivi a été réalisé par HPLC durant 76h.

L'ensemble des composés étudiés s'est révélé stable dans des conditions physiologiques. En effet, aucune dégradation n'a été observée après 76h.

II.3. Basicité et lipophilie

La lipophilie ($\log P$) est une propriété importante qui peut être le reflet de l'absorption, la distribution, le métabolisme, l'excrétion et la toxicité ainsi que de l'activité pharmacologique.

La détermination du (ou des) pK_a d'une molécule permet de déterminer le degré d'ionisation de cette molécule. Cette propriété peut donc avoir un impact majeur sur la solubilité et la perméabilité de la molécule.

Nous avons déterminé les $\log P$ et les pK_a des dérivés fluoroquinolones par prédiction grâce au logiciel Marvin Calculator5.2 de ChemAxon(12).

Nous avons émis l'hypothèse que les esters prodrogues fluoroquinolones sont hydrolysées en acide carboxylique et qu'elles agissent sous la forme zwitterionique de ces acides. Nous avons donc étudié la lipophilie et les pK_a (Tableau 21) de la Cipro sous sa forme

neutre et sous sa forme zwitterionique, de la Cipro-Bz sous sa forme acide neutre ou zwitterionique et de la Cipro-Ad sous sa forme acide neutre ou zwitterionique. Ces constantes ont été étudiées en comparaison avec celles des formes estérifiées des différentes molécules : Cipro-Et sous sa forme neutre et monoprotonée, Cipro-Bz sous sa forme neutre et monoprotonée et Cipro-Ad sous sa forme neutre et monoprotonée (*Figure 75*).

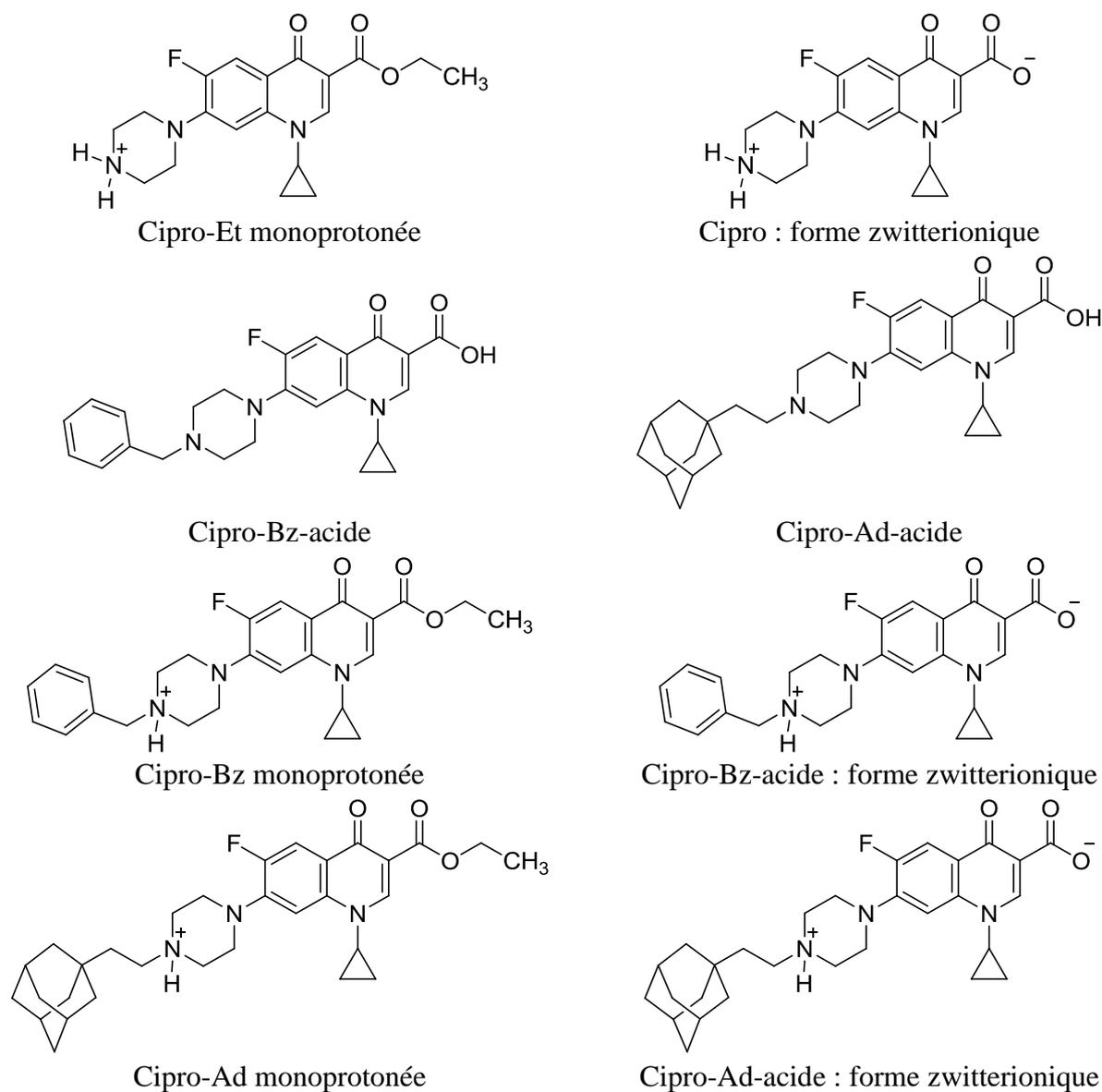


Figure 75 : Structures chimiques de la Cipro-Et monoprotonée, Cipro sous sa forme zwitterionique, Cipro-Bz sous sa forme acide, Cipro-Ad sous sa forme acide, Cipro-Bz monoprotonée, Cipro-Bz-acide sous sa forme zwitterionique, Cipro-Ad monoprotonée et Cipro-Ad sous sa forme zwitterionique.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'apicoplaste est délimité par quatre membranes. D'autre part, pour cibler l'apicoplaste, nos molécules doivent tout d'abord traverser la membrane de l'hématie puis la membrane parasitophore. De ce fait, il est crucial que nos molécules soient capables de traverser toutes ces membranes et donc qu'elles possèdent un juste équilibre dans leurs propriétés physico-chimiques pour améliorer ce passage membranaire.

Formes	Composés	Log <i>P</i>	p <i>K</i> _a
Esters éthyliques	Cipro-Et	2,29	8,67
	Cipro-Bz	4,35	6,69
	Cipro-Ad	5,25	7,58
	Cipro-Et monoprotinée	-0,93	8,67
	Cipro-Bz monoprotinée	0,95	6,69
	Cipro-Ad monoprotinée	1,85	7,58
Acides carboxyliques	Cipro	1,71	8,68 et 5,76
	Cipro-Bz-acide	3,77	6,74 et 5,70
	Cipro-Ad-acide	4,66	7,58 et 5,74
	Cipro (forme zwitterionique)	-4,20	8,68 et 5,76
	Cipro-Bz-acide (forme zwitterionique)	-2,32	6,74 et 5,70
	Cipro-Ad-acide (forme zwitterionique)	-1,42	7,58 et 5,74

Tableau 21 : Prédictions des valeurs de Log *P* et de p*K*_a.

Le comportement hydrophile élevé des acides carboxyliques (Cipro, Cipro-Bz-acide et Cipro-Ad-acide) suggèrent que ces formes devraient être moins efficaces pour traverser les multiples membranes que leurs homologues estérifiés. La concentration critique des médicaments qui affectent les fonctions de l'apicoplaste pourrait ainsi être atteinte plus rapidement permettant un effet antipaludique plus rapide et une diminution de « l'effet retard » habituellement observé avec cette famille de composés.

II.4. Activités anti-apicomplexes et cytotoxicité

II.4.1. Activités antipaludiques

Les activités antipaludiques des composés ont été déterminées par le Dr Bruno Pradines, sur une souche CQ-sensible (3D7), une souche CQ-résistante (W2), et une souche résistante à l'atovaquone (Tm90C2b) de *P. falciparum* (Tableau 22), à 48h (un cycle) et 96h (deux cycles).

Composés	CI ₅₀ (µM)					
	Après 48h			Après 96h		
	3D7	W2	Tm90C2b	3D7	W2	Tm90C2b
Cipro	47,0 ± 5,9	122,3 ± 19,0	71,8 ± 13,0	12,8 ± 4,7	16,8 ± 2,6	15,3 ± 3,5
Cipro-Et	2,33 ± 0,25	3,67 ± 0,41	3,56 ± 0,67	0,89 ± 0,18	0,84 ± 0,28	2,27 ± 0,20
Cipro-Fc	2,63 ± 0,27	4,82 ± 0,58	6,78 ± 0,72	1,59 ± 0,33	1,72 ± 0,23	1,82 ± 0,40
Cipro-Bz	1,08 ± 0,19	1,61 ± 0,23	2,56 ± 0,21	0,32 ± 0,14	0,49 ± 0,23	2,35 ± 0,48
Cipro-Ad	1,00 ± 0,40	2,06 ± 0,18	2,46 ± 0,23	0,41 ± 0,10	0,71 ± 0,23	2,23 ± 0,37

Tableau 22 : Activités antipaludiques de la Cipro, de la Cipro-Et, de la Cipro-Fc, de la Cipro-Bz et de la Cipro-Ad sur 3D7, W2 et Tm90C2b après 48h et 96h.

Les nouveaux analogues fluoroquinolones Cipro-Bz et Cipro-Ad sont plus actifs que la Cipro ou que les dérivés Cipro-Et et Cipro-Fc, après 48h ou 96 h de temps d'incubation.

En effet, le dérivé Cipro-Ad est de 29 à 60 fois plus actif que la Cipro contre les souches Tm90C2b et W2, et est 47 fois plus actif contre la souche CQ-sensible 3D7 après 48 h d'exposition au médicament et de 7 à 31 fois plus actif après 96 h.

Les composés Cipro-Ad et Cipro-Bz présentent des valeurs de CI₅₀ légèrement plus élevées contre la souche Tm90C2b comparativement à ce qui est observé contre 3D7 et W2.

Les activités antipaludiques *in vitro* de tous les composés fluoroquinolones ont augmenté après une exposition prolongée. Néanmoins, cet effet est moins marqué pour les composés présentant une fonction ester éthylique.

Précédemment, nous avons vu que les antibiotiques tels que la Cipro ou la doxycycline (DOX) exercent leur activité antipaludique avec un effet de "mort retardée" sur des souches ou isolats de *P. falciparum*.(9, 13, 14) Les prodrogues fluoroquinolones se sont révélées de 1,6 à 4,4 fois plus actives après 96 h d'exposition au médicament par rapport aux activités relevées après 48 h. Dans les mêmes conditions, la Cipro est de 3,7 à 7,3 fois plus active après 96h. Ce qui suggèrent que la stratégie prodrogue permet de diminuer l'effet de « mort retardée » et d'avoir une action antipaludique plus rapide.

Il est important de noter que les prodrogues fluoroquinolones organiques Cipro-Ad et Cipro-Bz présentent une activité antipaludique plus importante que la Cipro-Fc. Ces données suggèrent que la présence du Fc ne permet pas un gain net d'activité. D'autre part, il a été montré récemment(15) que contrairement à la vacuole digestive, l'apicoplaste est un environnement réducteur. De ce fait, le ferrocène (Fe^{II}) ne peut pas engendrer la production de radicaux HO° puisque cela supposerait un passage du Fe^{II} à Fe^{III} grâce à des conditions oxydantes. L'augmentation du stress oxydant obtenu avec la FQ dans la vacuole digestive ne peut donc pas être reproduit pour cette classe de composés qui cibleraient l'apicoplaste. De ce fait, les propriétés rédox du Fc n'interviennent pas dans l'activité antipaludique de ces molécules, suggérant ainsi que seul l'augmentation de la lipophilie des molécules serait le facteur prépondérant dans l'activité de ces molécules.

De plus, bien que la Cipro-Bz et la Cipro-Ad présentent des activités antipaludiques du même ordre de grandeur, la Cipro-Ad est légèrement plus active. L'encombrement stérique plus important de l'adamantane pourrait permettre une meilleure interaction de la molécule avec la cible thérapeutique.

II.4.2. Activités anti-toxoplasmiques

II.4.2.1. Activités *in vitro*

Parmi les études qui ont suivi la découverte de l'apicoplaste, un grand nombre d'entre elles ont été effectuées chez *T. gondii*. En effet, cet autre parasite apicomplexe possède la particularité d'avoir huit copies du génome circulaire de 35 kDa de l'apicoplaste du parasite (dans sa forme tachyzoïte) alors que *Plasmodium* n'en possède qu'une seule.(16) D'autre part, les similarités marquées entre l'apicoplaste de *T. gondii* et celui de *Plasmodium* ont poussé les scientifiques à utiliser le parasite de la toxoplasmose comme modèle de *Plasmodium*.(17)

Nous avons donc testé l'activité de nos composés sur des tachyzoïtes de *T. gondii*, en collaboration avec le Pr Rosiane Vomaro (Université fédérale de Rio de Janeiro, Brésil).

Composés	CI ₅₀ (µM)	
	24h	48h
Cipro	>20	>20
Cipro-Et	0,96 ± 0,18	0,42 ± 0,06
Cipro-Fc	2,95 ± 0,92	1,28 ± 0,20
Cipro-Bz	1,70 ± 0,68	1,24 ± 0,14
Cipro-Ad	0,92 ± 0,39	0,46 ± 0,06

Tableau 23 : Activités de la Cipro, de la Cipro-Et, de la Cipro-Fc, de la Cipro-Bz et de la Cipro-Ad sur des tachyzoïtes de *T. gondii*.

Les résultats montrent que ces composés présentent une bonne activité contre les tachyzoïtes de *T. gondii* à des concentrations relativement faibles. D'autre part, tous les composés testés se sont révélés plus actifs que la Cipro, notamment, les fluoroquinolones Cipro-Et et Cipro-Ad, qui inhibent la croissance du parasite avec une CI₅₀ en nanomolaires.

Des études cinétiques ont révélé que les nouveaux composés fluoroquinolones bloquent la prolifération des tachyzoïtes dans les 24 h de temps d'incubation, alors que la Cipro engendre une inhibition de la croissance du parasite seulement après le deuxième cycle de l'infection. Après 48 h d'exposition, les CI₅₀ sont inférieures à celles observées à 24 h, ce qui suggère que les prodrogues fluoroquinolones exercent un léger effet de "mort retardée" chez les parasites *T. gondii*.

II.4.2.2. Activités *in vivo*

L'activité *in vivo* (Figure 76) des prodrogues fluoroquinolones a été comparée avec celle de la Cipro et de la pyriméthamine, chez des souris Swiss infectées par *T. gondii*. Les souris ont été traitées une journée après l'infection, durant une période de sept jours.

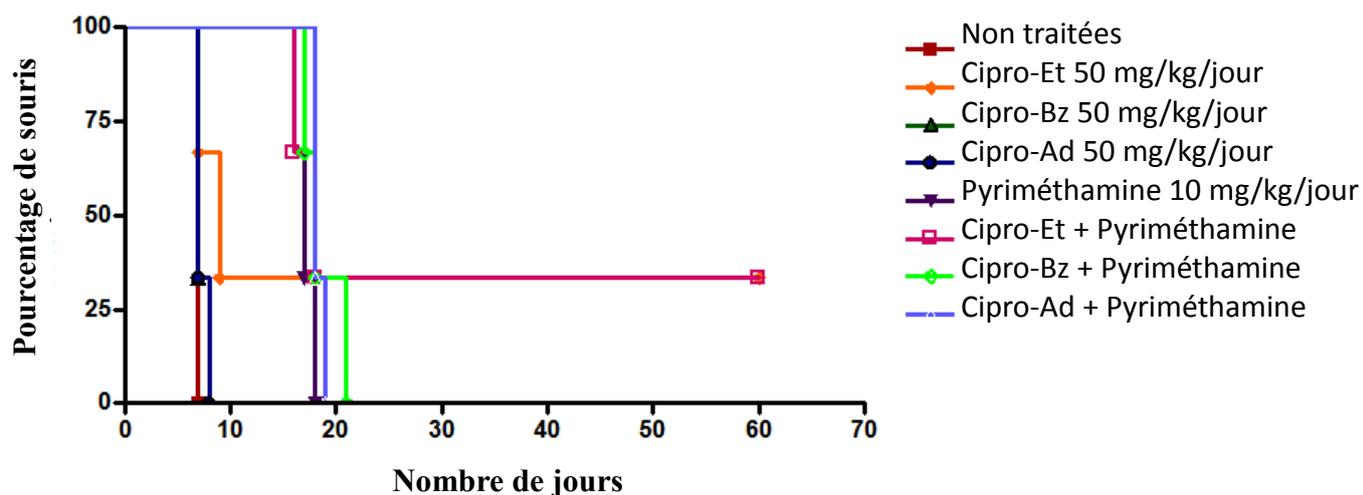


Figure 76 : Test *in vivo* des prodrogues fluoroquinolones chez la souris swiss pour un traitement de 7 jours à la dose de 50 mg/kg/jours. Pourcentage de souris vivantes en fonction du nombre de jours.

A la dose de 50 mg/kg/ jour, la Cipro-Bz et la Cipro-Ad présentent des taux de survie identiques à ce qui a été déterminé pour les souris non traitées, la totalité des souris étant décédées après une dizaine de jours. L'ajout de pyriméthamine permet d'améliorer la survie des souris, la totalité des souris étant décédée après une vingtaine de jours. Néanmoins, ce résultat est similaire à ce qui a été obtenu pour la pyriméthamine seule, laissant supposer que l'amélioration n'est due qu'à la pyriméthamine et non à un effet additif.

La Cipro-Et permet d'avoir un taux de survie de 27% jusqu'au soixantième jour. L'ajout de pyriméthamine permet de retarder la mort des souris. En effet, un taux de survie de 60% est observé à une dizaine de jour avec la Cipro-Et seule alors que ce taux est obtenu jusqu'au vingtième jour avec l'ajout de pyriméthamine. Au-delà du vingtième jour, les résultats sont similaires en absence ou en présence de pyriméthamine.

Les tests *in vitro* avaient montré que la Cipro-Ad et la Cipro-Bz étaient les molécules les plus actives, les tests *in vivo* montrent le contraire, laissant supposer une moins bonne biodisponibilité des nouvelles prodrogues.

II.5. Cytotoxicité

II.5.1. Cytotoxicité *in vitro*

La toxicité *in vitro* des composés a été évaluée en collaboration avec le Pr Rossiane C. Vommaro (Université fédérale de Rio de Janeiro, Brésil) et Dr Jamal Khalife (IPL, Lille, France) sur des cellules de rate de souris et sur une lignée cellulaire LLC-MK2 (cellules de rein de singe rhésus), (*Partie expérimentale*).

Composés	DL ₅₀ (μ M)	
	LLC-MK2	Splénocytes murins
Cipro	N.D.	>40
Cipro-Et	>30	>40
Cipro-Fc	>30	>40
Cipro-Bz	>30	57 \pm 13
Cipro-Ad	27,8 \pm 3,7	>100

Tableau 24 : Cytotoxicité de la Cipro, de la Cipro-Et, de la Cipro-Fc, de la Cipro-Bz et de la Cipro-Ad.

Tous les composés présentent une cytotoxicité relativement faible (*Tableau 24*). Le dérivé Cipro-Ad possède l'activité cytotoxique la plus faible ainsi que l'activité antipaludique la plus élevée. De ce fait, ce composé possède l'indice thérapeutique le plus haut et donc est le composé le plus intéressant de cette série.

II.5.2. Cytotoxicité *in vivo*

La toxicité *in vivo* de la Cipro-Et, la Cipro-Ad et la Cipro-Bz a été testée chez des souris, en collaboration avec le Pr Rossiane C. Vommaro (Université fédérale de Rio de Janeiro, Brésil).

Dans un premier temps, la toxicité des composés a été évaluée en mesurant l'impact d'une administration monodose sur la prise de poids de l'animal.

Composés	Doses (mg/kg)	Poids initial (g)	Poids après 48h (g)	% prise de poids après 48h
Cipro-Et	25	19,87	22,25	11
	50	19,15	20,92	8
	100	20,71	22,27	7
	200	20	22,17	10
Cipro-Bz	25	21,21	23,85	11
	50	19,30	22,72	15
	100	19,21	21,94	12
	200	19,93	22,20	10
Cipro-Ad	25	20,65	23,10	11
	50	20,80	22,12	6
	100	20,45	23,50	13
	200	21,11	23,28	9

Tableau 25 : Evaluation de l'impact d'une administration monodose de 25 mg/kg, de 50 mg/kg, de 100 mg/kg ou de 200 mg/kg de Cipro-Et, de Cipro-Bz ou de la Cipro-Ad sur la prise de poids chez la souris.

Ces résultats montrent que l'administration monodose de Cipro-Et, de Cipro-Bz et de Cipro-Ad n'engendre pas de diminution de poids chez la souris, la prise de poids est d'environ 10 % au bout de 48h pour tous les composés et pour toutes les doses. Ces données suggèrent qu'un traitement monodose de nos prodrogues n'engendre pas de souffrance chez la souris même à la dose de 200 mg/g.

Dans un second temps, les paramètres biochimiques ont ensuite été évalués après l'administration monodose de nos prodrogues. Nous avons étudié le taux d'urée, le taux de créatinine kinase et le taux de l'alanine amino transférase / glutamate pyruvate transaminase (ALT/TGP).

Le taux d'urée dépend de la fonction rénale, un taux anormalement élevé sera un signe de dysfonctionnement du rein. L'activité de l'enzyme créatinine kinase est le reflet de l'activité rénale. L'ATP/TGP est une enzyme présente dans le foie en grosse quantité, un taux élevé de cette enzyme peut être le signe d'un dysfonctionnement hépatique.

		Urée	Créatinine kinase	ATP/TGP
		(mg/dL)	(U/L)	(U/L)
Valeurs de référence		18-29	68-1070	28-132
Composés	Dose (mg/kg)			
Cipro-Et	0	53		
	25	55,8	172	13
	50	51,2	182	
	100	55,1	578	
	200	49,3	583	
Cipro-Ad	0	48	420	
	200	51,5	467	
Cipro-Bz	0	46.7	563	
	25	49.2		65
	50	50.6	506	58
	100	52.8		66
	200	46.2	1541	51

Tableau 26 : Taux d'urée, de créatinine kinase et d'ATP/TGP évalués chez la souris après administration d'une monodose de 0, 25, 50, 100 ou 200 mg/kg de Cipro-Et, de Cipro-Ad ou de Cipro-Bz.

Ces résultats montrent que la Cipro-Et n'engendre pas d'augmentation du taux de créatinine kinase. Le taux d'urée obtenu avec ce composé est supérieur à la dose de référence, cependant, en absence de traitement, le taux d'urée est également supérieur à la dose de référence, suggérant que ce haut taux n'est pas le résultat de l'administration du composé chez la souris. Le taux d'ATP/TGP n'a pu être déterminé qu'à la dose de 25 mg/kg, bien que ce taux soit légèrement plus bas que le taux de référence, il reste néanmoins acceptable.

Ces données montrent que la Cipro-Ad n'a aucun effet sur les taux d'urée et de créatinine kinase à la dose la plus haute de 200 mg/kg. Les taux d'ATP/TGP n'ont pas été déterminés.

La Cipro-Bz engendre une augmentation importante du taux de créatinine kinase à la dose de 200 mg/kg ce qui suggèrent que ce composé pourrait engendrer une toxicité rénale.

Le taux d'urée obtenu avec ce composé est supérieur à la dose de référence, cependant, en absence de traitement, le taux d'urée est également supérieur à la dose de référence, suggérant que ce haut taux n'est pas le résultat de l'administration du composé chez la souris. Le taux d'ATP/TGP n'a pas été affecté par le traitement par la Cipro-Bz.

Ces données suggèrent que seul la Cipro-Bz engendre une toxicité chez la souris et qu'un traitement avec ce composé pourrait engendrer des complications rénales.

II.6. Ultrastructure

Les résultats précédents montrent que la Cipro-Bz peut engendrer des effets secondaires, c'est pourquoi nous avons choisi d'étudier l'ultrastructure des parasites de *T. gondii* en présence de Cipro-Et et de Cipro-Ad, en comparaison avec un contrôle non traité.

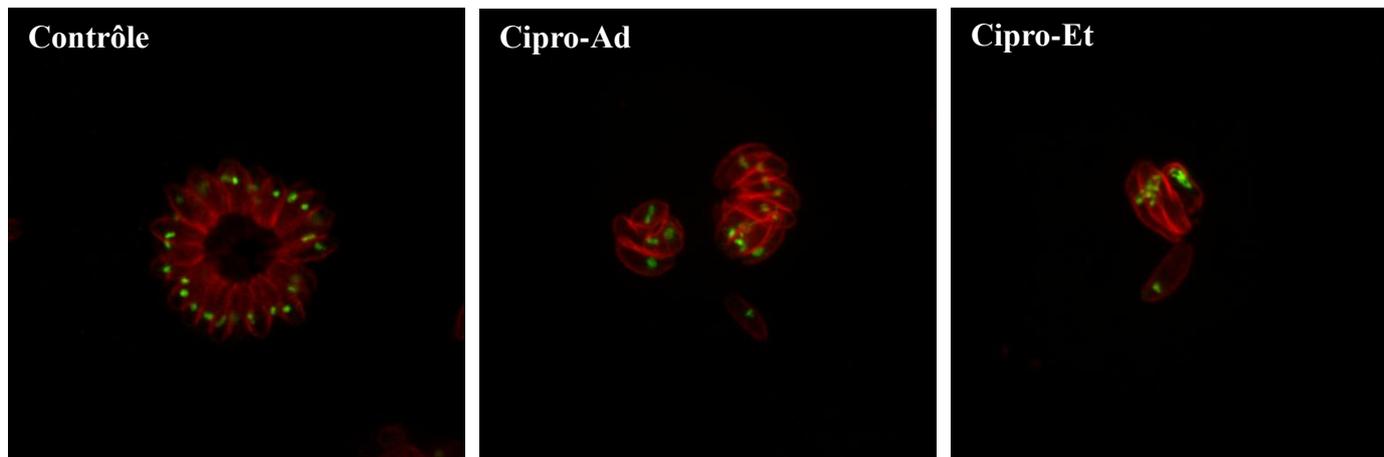


Figure 77 : Etude de la division cellulaire de *T. gondii* en présence de Cipro-Ad ou Cipro-Et, ou en absence de drogue (contrôle). Le complexe membranaire apparaît en rouge, tandis que l'apicoplaste apparaît en vert.

Dans le contrôle, les rosettes sont bien définies et chaque parasite présente un apicoplaste, d'autre part, sans traitement, la formation des cellules filles se déroule normalement avec une division normale de l'apicoplaste.

Lorsque les parasites sont traités par la Cipro-Ad, la division parasitaire est affectée, conduisant au regroupement des cellules filles. De plus, les cellules filles produites après un traitement avec la Cipro-Ad, présentent des apicoplastes irréguliers, de tailles anormales.

Pour les parasites traités avec la Cipro-Et, la division parasitaire est également affectée et les cellules filles présentent des apicoplastes anormalement élargis.

Ces résultats montrent que les prodrogues fluoroquinolones engendrent des problèmes dans la division cellulaire chez *T. gondii*, notamment au niveau de l'apicoplaste. En effet, l'apicoplaste est bien présent dans chaque cellule fille mais il présente une taille plus grande que la normale, témoignant d'un réel impact du traitement sur la division apicoplastique. Ces données suggèrent que les prodrogues fluoroquinolones cibleraient bien l'apicoplaste chez *T. gondii*.

II.7. Vers une validation de la cible ?

II.7.1. Etude de docking

Les fonctions de l'apicoplaste, comme la réplication, la transcription, et la traduction de l'ADN ainsi que les voies anaboliques de synthèse des acides gras, des précurseurs des isoprénoïdes, de l'hème et des complexes [Fe-S], rendent cet organelle essentiel à la survie du parasite du paludisme. Plusieurs anti-bactériens ciblant ces voies ont démontré des capacités à engendrer la mort de *Plasmodium spp*(18, 19), cependant la validation de la cible à l'intérieur du parasite reste délicate. Il a été montré que la Ciprofloxacine cible le génome de l'apicoplaste de *P. falciparum*, plus particulièrement la gyrase de l'apicoplaste, inhibant ainsi la réplication de l'ADN et conduisant à une « mort retardée » du parasite.(2, 8, 20)

Les données précédentes montrent que la Cipro-Ad est la molécule la plus efficace, suggérant que l'encombrement stérique et la lipophilie de cette molécule seraient essentiels à son activité. Néanmoins, ces données ne permettent pas de montrer la haute affinité de la molécule pour le site d'action présumé, l'ADN gyrase.

Nous avons donc étudié le rôle possible de l'ADN gyrase dans le mécanisme d'action de ces nouveaux composés, grâce à une étude de docking utilisant une structure modélisée.

Les études de docking ont été réalisées en collaborations avec le Dr René Wintjens (Faculté de Pharmacie, Université Libre de Bruxelles, Belgique).

II.7.1.1. Construction du modèle

II.7.1.1.1. Alignement de séquences

Nous avons réalisé un alignement de séquence entre l'ADN gyrase de *P. falciparum* (et *T. gondii*) et la topoisomérase II de *Streptococcus aureus* (*S. aureus*).

Les alignements de séquences ainsi obtenus sont détaillées ci-dessous (Figures 78 et 79).

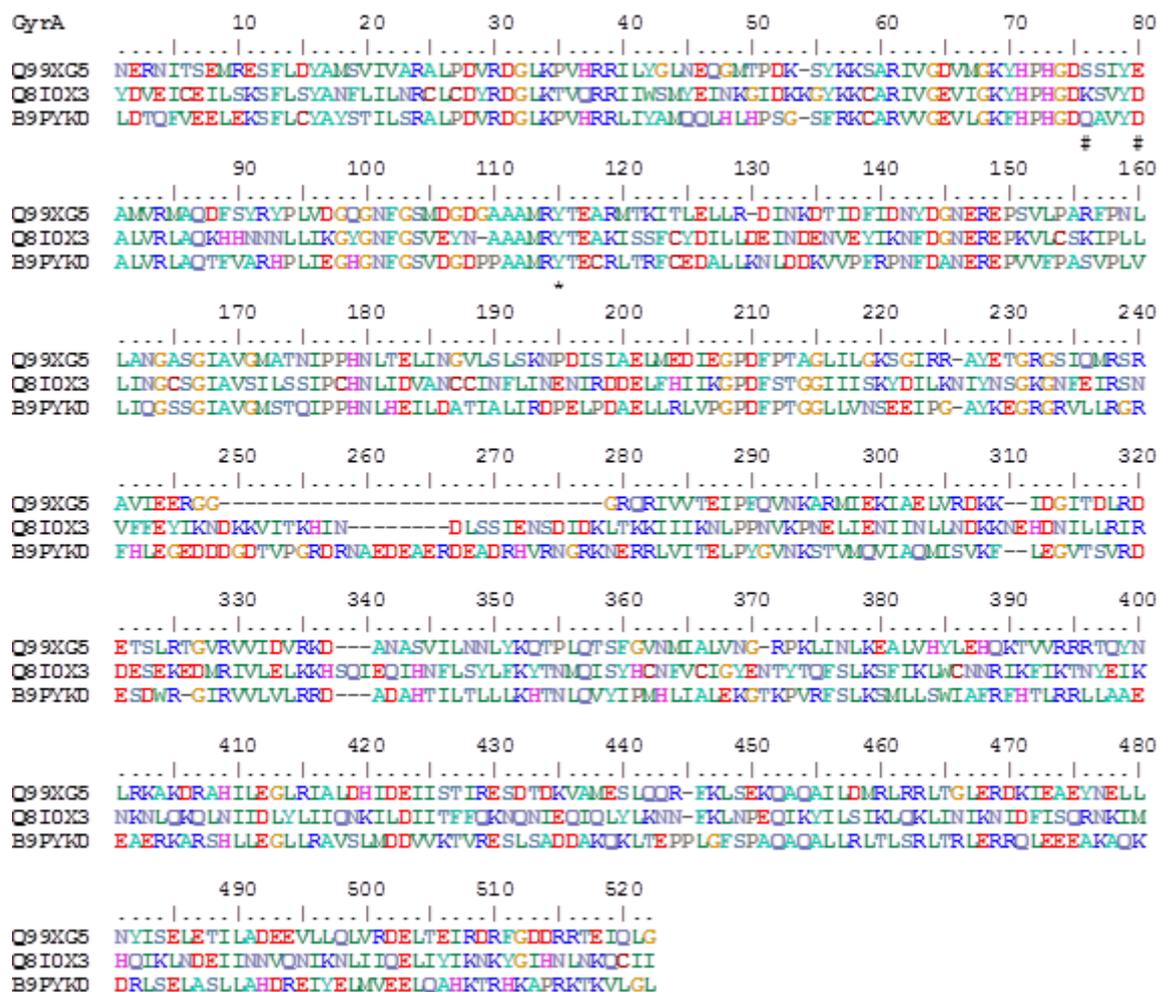


Figure 78 : Alignement de séquence multiple entre la séquence de l'ADN gyrase de *S. aureus* (Q99XG5), *P. falciparum* (Q8I0X3) et *T. gondii* (B9PYK0). (21) Sous-unité A. Le résidu catalytique est indiqué par (*) en dessous de la séquence. Les deux résidus clés de la région QRDR (région correspondante à la résistance aux quinolones) sont Ser84 et Asp84 et sont repérés par (#) en dessous de la séquence.

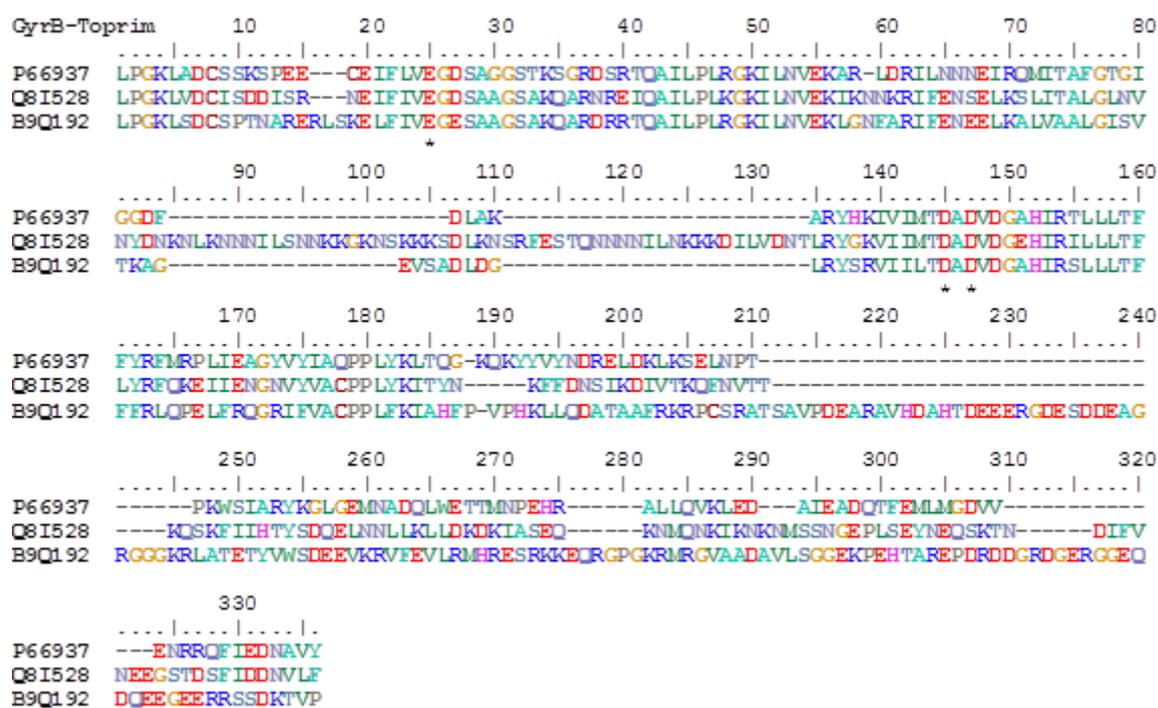


Figure 79 : Alignement de séquence multiple entre la séquence de l'ADN gyrase de *S. aureus* (P66937), *P. falciparum* (Q8I528) et *T. gondii* (B9Q192).(21) Sous-unité B. Les trois résidus catalytiques sont indiqués par (*) en dessous de la séquence.

Le degré d'identité de séquence est de 31% ce qui est suffisant pour utiliser ce modèle dans nos études de docking.

II.7.1.1.2. Modèle des ADN gyrases de *P. falciparum* et *T. gondii*

Il a été montré que la présence d'ions magnésium non-catalytiques est important pour médier l'interaction entre les dérivés fluoroquinolones et la protéine.(22, 23) De ce fait, nous avons conservé la présence de ces ions Mg^{2+} dans les processus de docking.

Les modèles ont été construits à partir de la séquence entière puis nous avons sélectionné les modèles finaux parmi ceux ayant obtenus le meilleur score d'énergie, c'est-à-dire ceux d'énergie la plus basse.

Dans la représentation ci-après, le code couleur suivant a été utilisé : la gyrase A est colorée en orange, la gyrase B est en bleu clair, l'ADN est représenté avec les atomes de carbone en vert, les molécules de Cipro sont représentées avec les atomes de carbone en jaune, les ions magnésium liés à la Cipro sont en pourpre alors que les ions magnésium catalytiques sont en violet. Les atomes d'oxygène sont en rouge, les atomes d'azote sont en

bleu, les atomes de fluor sont en rose, et le phosphate est en magenta. Pour plus de clarté, les boucles n'ayant pas été modélisées ne sont pas inclus dans ce schéma



Figure 80 : Représentation du modèle de l'ADN gyrase de *P. falciparum*.(21)

II.7.1.1.3. Préparation des ligands

Selon le pH du milieu, la Cipro et ses dérivés peuvent exister sous trois formes chimiques distinctes : la forme cationique, la forme anionique et la forme zwitterionique. Pour la Cipro, les valeurs expérimentales des pK_{a1} et pK_{a2} sont respectivement de 5,9 et 8,29. Pour le dérivé benzylique, les valeurs prédites des pK_{a1} et pK_{a2} sont 5,7 et 6,7. Pour le dérivé adamantylique, les valeurs prédites des pK_{a1} et pK_{a2} sont 5,7 et 7,6. A pH physiologique, les ligands sont donc majoritairement sous forme zwitterionique. Ces formes ont donc été utilisées lors des calculs de docking.

II.7.1.2. Docking

Nous avons réalisé le docking des fluoroquinolones dans la région QRDR des ADN gyrases modélisées par homologie. La conformation des ligands a été déterminée grâce à un algorithme génétique Lamarckien.

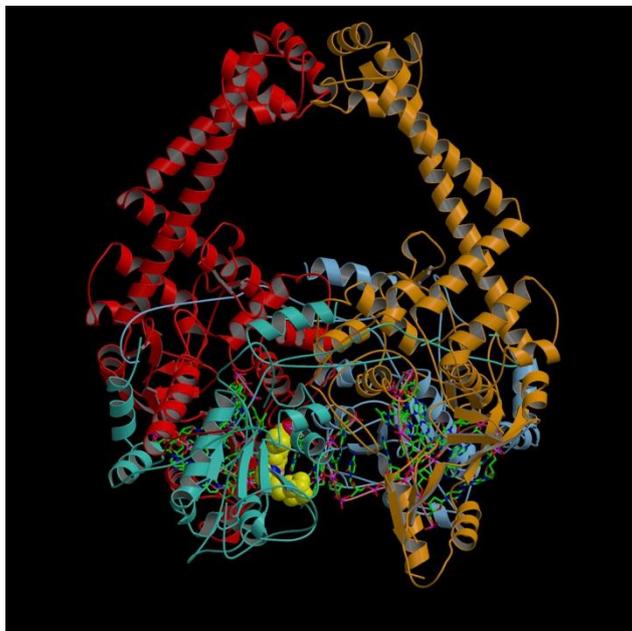


Figure 81 : Modèle de la gyrase de *P. falciparum* en interaction avec le composé Cipro-Ad (sous forme zwitterionique).

Le docking de la Cipro avec le modèle de l'ADN gyrase de *P. falciparum* et *T. gondii* indique que l'interaction est stabilisée, avec une énergie de liaison estimée inférieure à $-12 \text{ kcal.mol}^{-1}$.

La liaison est en grande partie constituée d'interaction de Van der Waals et d'interaction par empilement π - π . Le composé est intercalé dans une paire de bases d'ADN, de ce fait peu d'interactions directes avec la protéine ont été détectées. Les résidus correspondants à Ser84, c'est-à-dire Lys248 ou Gln348, sont les principaux résidus qui interagissent. L'ion Mg^{2+} chélaté par la Cipro contribue à l'énergie de liaison, grâce à des interactions avec la protéine et avec l'ADN.

Des résultats similaires ont été obtenus pour le docking des formes zwitterioniques des composés Cipro-Bz et Cipro-Ad. Le phényle ou l'adamantane permettent des interactions

supplémentaires de type Van der Waals, néanmoins les énergies libres de liaison estimées sont du même ordre de grandeur que celles obtenus avec la Cipro.

Composés	Energie de liaison avec l'ADN gyrase de <i>P. falciparum</i> (kcal.mol ⁻¹)	Energie de liaison avec l'ADN gyrase de <i>T. gondii</i> (kcal.mol ⁻¹)
Cipro	-12.33	-15.14
Cipro-Bz	-13.94	-16.12
Cipro-Ad	-13.03	-15.28

Tableau 27 : Energies de liaison des fluoroquinolones (Cipro, Cipro-Bz et Cipro-Ad → sous formes zwitterioniques) avec l'ADN gyrase de *P. falciparum* et l'ADN gyrase de *T. gondii*.

Une différence d'énergie de liaison est considérée comme significative lorsqu'elle est de l'ordre de 2,0 à 2,5 kcal.mol⁻¹.(24) Dans notre étude de docking, les différences d'énergie d'interaction entre les différents composés fluoroquinolones ne nous permettent pas de conclure quant à une affinité plus élevée de l'une ou l'autre de nos molécules. De plus, ces résultats ne nous permettent pas de mettre en relation l'activité antipaludique et antitoxoplasmique de nos molécules avec une affinité pour la cible. Ces données suggèrent que la plus haute activité des prodrogues et notamment des prodrogues comportant une substitution sur le noyau pipérazine, serait due à la plus grande lipophilie de ces composés par rapport à la Cipro et donc à un meilleur passage membranaire.

II.7.2. Fluorescence des rayons X

II.7.2.1. Préambule

Précédemment, nous avons montré que la détection d'atomes fluorescents, comme les atomes de Cl, peut être utilisée pour localiser un médicament dans la cellule, et ce malgré leur présence endogène dans les cellules: ions métalliques, chlore, fluor ...

Les fluoroquinolones contiennent un atome de fluor dans leur structure ce qui pourrait permettre leur localisation à l'intérieur du parasite et ainsi valider leur présence dans l'apicoplaste.

L'énergie de transition du Fe pour la couche K correspond à 7126 eV, à 22127 eV pour le Ru, à 2832 eV pour le Cl et à 2481 eV pour le S. L'énergie de transition de l'atome de fluor sur sa couche K est de 686 eV soit environ dix fois inférieure à celle du Fe. La gamme d'énergie de la ligne ID22 de l'ESRF est comprise entre 6,5 et 65 keV, de ce fait il n'est pas possible d'étudier la distribution de l'élément fluor grâce à cet appareillage.

D'autre part, l'analyse d'éléments à faible numéro atomique peut être limitée par un rendement de fluorescence faible, il est donc primordial d'utiliser un système doté de détecteurs adaptés. La ligne Twinmic du synchrotron Elettra (Trieste, Italie) possède une gamme d'énergie comprise entre 280 à 2200 eV permettant de travailler avec divers éléments (Figure 82), et ce simultanément. D'autre part, le signal est détecté par un ensemble de huit détecteurs de type SDD (silicium) permettant ainsi de compenser le faible rendement fluorescent des éléments à faible numéro atomique.

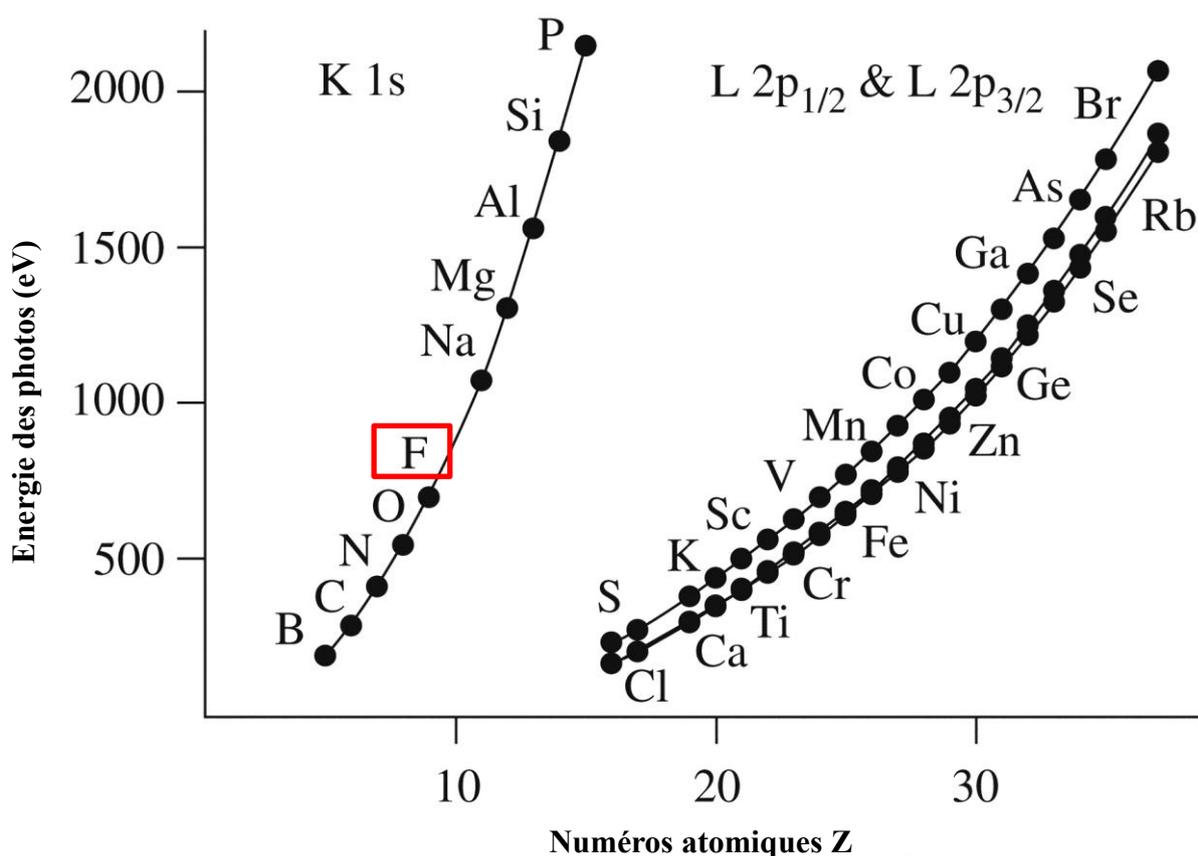


Figure 82 : Éléments analysables sur la ligne TwinMic d'Elettra (Trieste, Italie).(25)

Ces gammes d'énergie nous permettent également de pouvoir réaliser la cartographie des atomes de Fe en utilisant l'énergie d'excitation de la raie L (860 eV).

II.7.2.2. Etude de l'accumulation des fluoroquinolones

Nous avons choisi de comparer la localisation de la Cipro-Fc et de la Cipro-Ad. La Cipro-Ad est la molécule la plus active, qui possède le meilleur index thérapeutique. Bien que l'activité de la Cipro-Fc ne soit pas supérieure à celle de la Cipro-Ad, la localisation de la Cipro-Fc nous permettra d'étudier l'impact de l'introduction d'un Fc dans la structure de ces molécules, vis-à-vis de la localisation.

Nous avons réalisé la co-localisation des atomes de F, de Fe et de C dans des hématies parasitées par une souche CQ-sensible HB3 et traitées par la Cipro-Fc ou Cipro-Ad, ou non traitées (contrôle). La localisation des atomes de F devrait nous permettre de localiser nos molécules à l'intérieur du parasite. La localisation des atomes de Fe, nous permettra de localiser avec précision l'emplacement du pigment malarique et donc de la vacuole digestive. La localisation du C, nous servira à déterminer les ratios d'accumulation relatif du F en fonction des zones, les atomes de C devraient être uniformes sur toute la cellule.

II.7.2.2.1. Temps d'incubation de 24h

II.7.2.2.1.1. Cipro-Fc

Les études ont été réalisées sur des hématies infectées par une souche CQ-sensible HB3 et traitées par de la Cipro-Fc (2 μ M) avec un temps d'incubation de 24 h. Un contrôle, non traité a également été réalisé. Les hématies ont été déposées en monocouche sur des cellules en nitrure de silicium de 200 nm d'épaisseur.

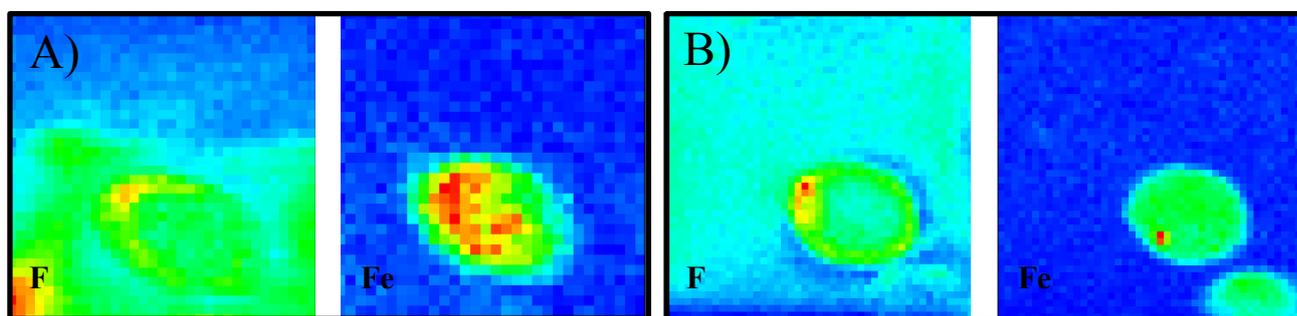


Figure 83 : Nano-imagerie par rayonnement synchrotron en fluorescence des rayons X. A) Hématie parasitée par la souche CQ-sensible HB3 et non traitée ; B) Hématie parasitée par la souche CQ-sensible HB3 et traitée par la Cipro-Fc (24h de temps d'incubation).

Dans le contrôle, la cartographie du F ne montre pas d'accumulation de F dans le parasite, alors que la cartographie du Fe montre une zone d'accumulation correspondante à la vacuole digestive du parasite. Sur les cartographies obtenues pour la Cipro-Fc, la zone d'accumulation des atomes de Fe apparaît bien différente de la zone d'accumulation des atomes de F, ce qui suggère que la Cipro-Fc s'accumule en dehors du compartiment vacuolaire du parasite.

II.7.2.2.1.2. Cipro-Ad

Les études ont été réalisées sur des hématies infectées par une souche CQ-sensible HB3 et traitées par de la Cipro-Ad (2 μ M) avec un temps d'incubation de 24 h.

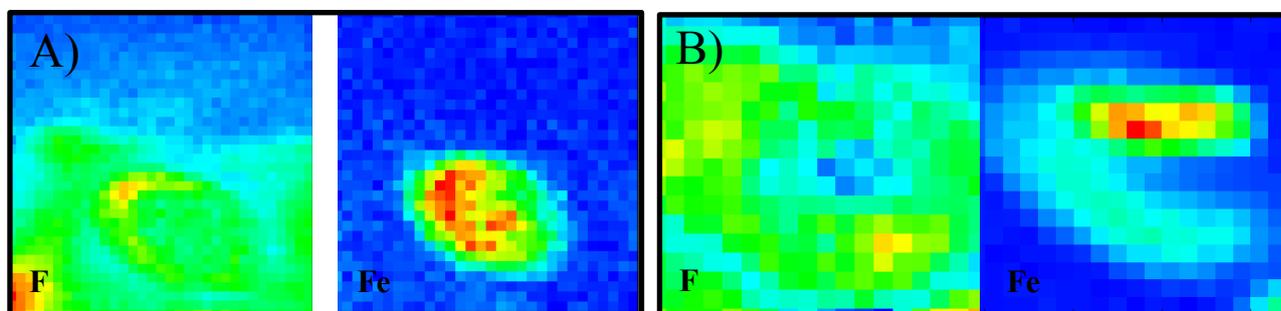


Figure 84 : Nano-imagerie par rayonnement synchrotron en fluorescence des rayons X. A) Hématie parasitée par la souche CQ-sensible HB3 et non traitée ; B) Hématie parasitée par la souche CQ-sensible HB3 et traitée par la Cipro-Ad (24h de temps d'incubation).

L'observation des cartographies des atomes de Fe des hématies traitées par la Cipro-Ad, permettent de localiser la vacuole digestive du parasite. Cependant, la cartographie des atomes de fluor ne montrent pas d'accumulation de fluor à l'intérieur du parasite. Cette observation n'est pas en accord avec les résultats obtenus dans les tests d'activités. En effet, la Cipro-Ad étant la molécule la plus active, on aurait pu s'attendre à une accumulation plus importante de cette molécule par rapport à ce qui a été observé pour la Cipro-Fc.

II.7.2.2.2. Temps d'incubation de 48h

Nous avons étudié l'accumulation de la Cipro-Fc dans des hématies parasitées par la souche CQ-sensible HB3 et traitées par la Cipro-Fc avec un temps d'incubation de 48h.

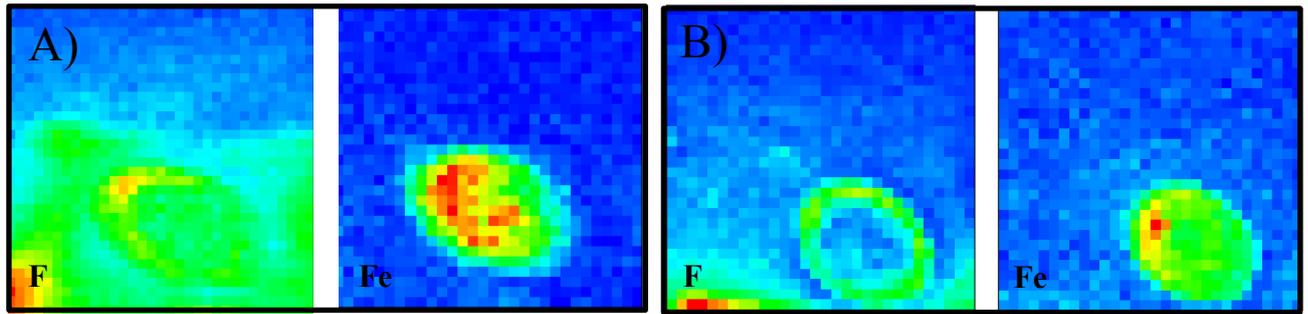


Figure 85 : Nano-imagerie par rayonnement synchrotron en fluorescence des rayons X. A) Hématie parasitée par la souche CQ-sensible HB3 et non traitée ; B) Hématie parasitée par la souche CQ-sensible HB3 et traitée par la Cipro-Fc (48h de temps d'incubation).

Contrairement à ce qui a été observé après un temps d'incubation de 24h et tandis que l'accumulation des atomes de Fe nous a permis de localiser le compartiment vacuolaire, aucune accumulation des atomes de fluor n'a pu être observée à l'intérieur du parasite. Ces données sont en contradiction avec les données précédentes.

II.7.2.2.3. Comparaison des ratios F/C

II.7.2.2.3.1. Cipro-Fc

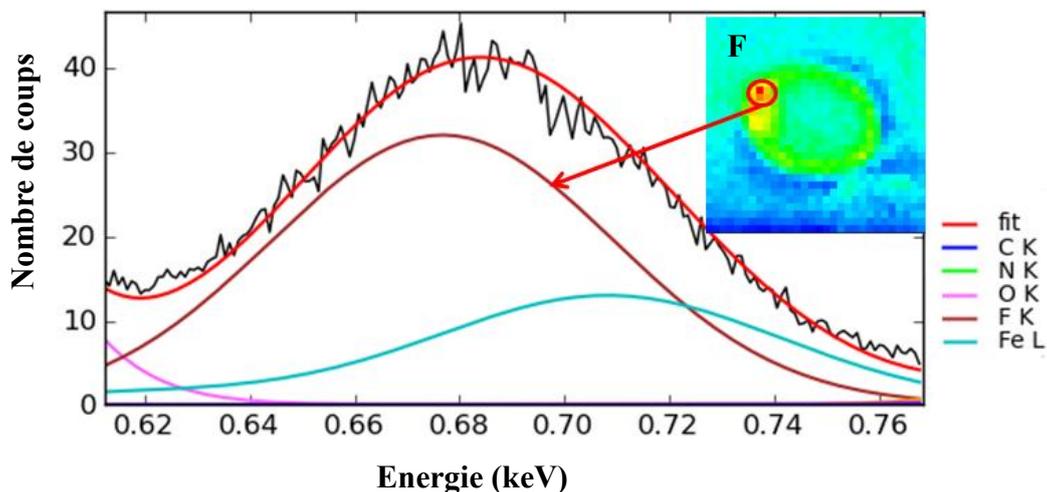


Figure 86 : Hématie parasitée par la souche CQ-sensible HB3 et traitée par la Cipro-Ad (24h). Distribution du F dans la zone d'accumulation du F.

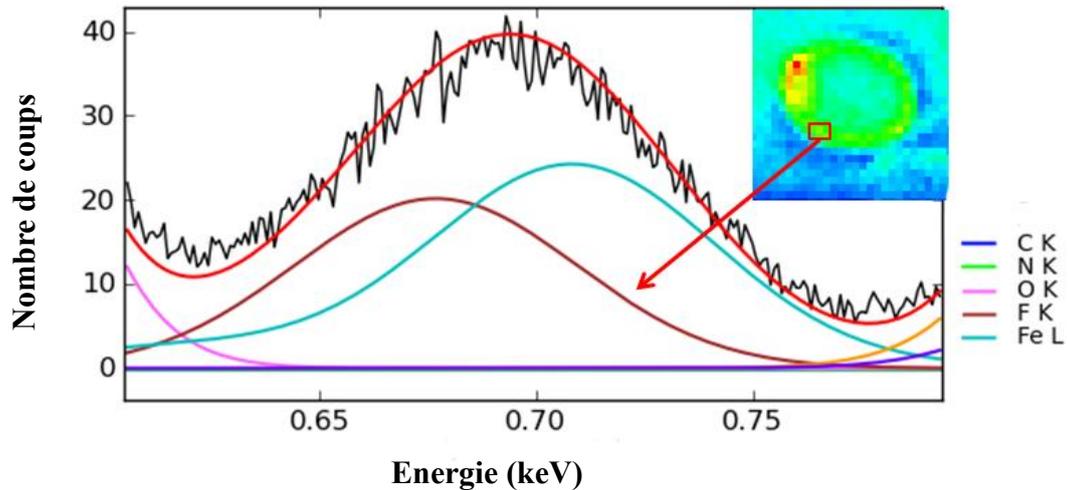


Figure 87 : Hématie parasitée par la souche CQ-sensible HB3 et traitée par la Cipro-Ad (24h). Distribution du F dans la zone d'accumulation du Fe (vacuole digestive).

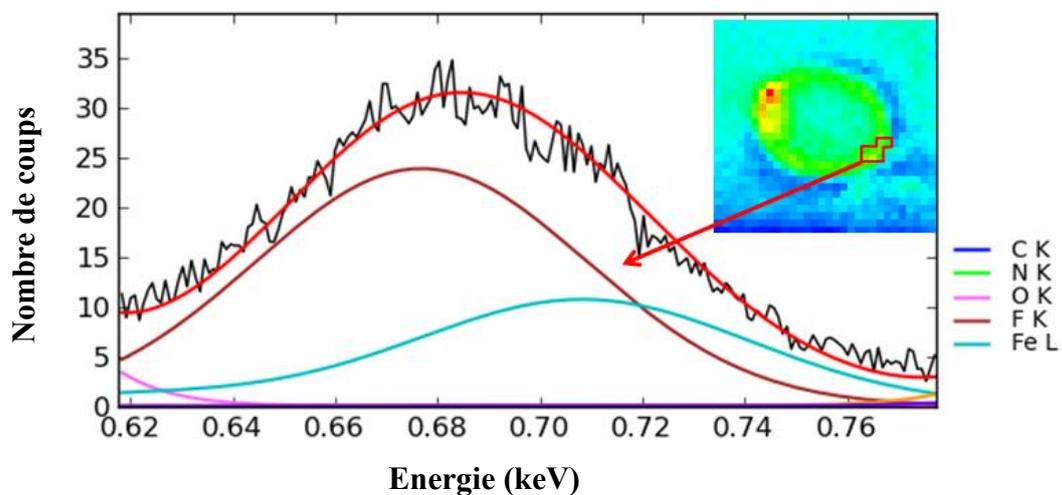


Figure 88 : Hématie parasitée par la souche CQ-sensible HB3 et traitée par la Cipro-Ad (24h). Distribution du F une zone extérieure à la vacuole digestive et extérieure à la zone d'accumulation du F (cytoplasme).

A partir de ces données, nous avons calculé les ratios de l'intensité des atomes de F par rapport à l'intensité des atomes de C pour déterminer les zones contenant le plus de F à l'intérieur du parasite.

Zone	Ratio F/C
Zone d'accumulation des atomes de F	0,284
Vacuole digestive	0,169
Cytoplasme	0,274

Tableaux 28 : Ratios F/C dans la zone d'accumulation des atomes de F, dans la vacuole digestive et dans le cytoplasme d'hématies parasitées par HB3 et traitées par Cipro-Fc (24h).

Ces données montrent qu'aucune différence ne peut être faite entre le ratio calculé entre la zone d'accumulation des atomes de F et le cytoplasme. Même si une valeur inférieure est déterminée pour la vacuole digestive, il reste difficile de conclure quant à la présence ou non de Cipro-Fc dans l'apicoplaste du parasite.

Des calculs similaires ont été faits après 48h d'incubation du composé, un ratio F/C identique a été trouvé dans l'ensemble du parasite, les calculs ayant été faits sur diverses zones du cytoplasme et est de 0,220 environ. Dans la vacuole digestive, ce ratio est légèrement plus faible et est de 0,117. Nous n'avons pas observé de zone d'accumulation de F dans l'hématie parasitée par HB3 et incubée 48h avec la Cipro-Fc, ces données montrent qu'aucune accumulation spécifique du composé n'a pu être observée.

II.7.2.2.3.2. Cipro-Ad

Des calculs similaires ont été faits après 24h d'incubation du composé Cipro-Ad, un ratio F/C identique a été trouvé dans l'ensemble du parasite, les calculs ayant été faits sur diverses zones du cytoplasme et est de 0,140 environ. Dans la vacuole digestive, ce ratio est plus faible et est de 0,095. Nous n'avons pas observé de zone d'accumulation de F dans l'hématie parasitée par HB3 et incubée 24h avec la Cipro-Ad, ces données montrent qu'aucune accumulation spécifique du composé n'a pu être observée.

II.7.2.2.3.3. Contrôle

Dans le contrôle, c'est-à-dire dans les hématies parasitées non traitées, le ratio F/C est de 0,147 dans la vacuole digestive et est de 0,159 dans le cytoplasme.

Les ratios obtenus pour le contrôle sont du même ordre de grandeur que ceux obtenus pour les hématies traitées par Cipro-Fc et Cipro-Ad, et ce quel que soit le temps d'incubation

(24 ou 48h). Ces données suggèrent que les composés ne seraient pas capables de s'accumuler dans les parasites *P. falciparum*.

Nous avons mesuré les ratios F/C à la périphérie des hématies, des résultats similaires à ceux obtenus pour les contrôles ont été obtenus, ce qui suggèrent que le milieu de culture contiendrait du F.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé le dépôt de milieu de culture exempt de toute hématie et non traité. Ce dépôt a été réalisé dans les mêmes conditions que celles utilisées pour le dépôt des hématies. Le résultat de cette expérience montre que le milieu de culture contient une grande quantité de F. De ce fait, nous pouvons conclure que les signaux de fluor observés dans ces expériences correspondent en réalité au fluor présent dans le milieu de culture, et ce malgré un rinçage important des cellules, ce qui explique pourquoi les taux de fluor sont similaires dans toutes les zones et dans toutes les cartographies étudiées.

II.7.3. Activités biologiques chez *C. parvum*

Les prodrogues fluoroquinolones présentent des activités antipaludiques et anti-toxoplasmiques. Il a été supposé que ces molécules agirait en ciblant l'ADN gyrase de l'apicoplaste de ces parasites. Nos expériences de docking ne nous ont pas permis de corréler les activités de nos molécules avec une affinité pour la cible. D'autre part, la localisation du F dans les parasites n'ayant pu aboutir, il reste délicat de conclure quant au mécanisme d'action de nos prodrogues.

Dans le phylum des apicomplexa, *C. parvum* est le seul apicomplexe qui ne possède pas d'apicoplaste, de ce fait les prodrogues fluoroquinolones ne devraient pas présenter d'activité envers ce parasite.

Les activités biologiques sur *C. parvum* de la Cipro et des prodrogues fluoroquinolones ont été déterminées en collaboration avec le Dr Philippe Lawton (Faculté de Pharmacie de Lyon, France). L'activité des molécules est mesurée en mesurant l'inhibition de la croissance cellulaire d'oocystes de *C. parvum*. Les oocystes ont été extraits des fèces d'un veau atteint de cryptosporidiose.

L'inhibition de la croissance cellulaire des oocystes a été déterminée à trois concentrations distinctes : 12,5 μM , 25 μM et 50 μM . La culture *in vitro* des oocystes a été réalisée dans des cellules épithéliales de rein de bovin, MDBK (Martin Darby Bovin Kidney).

Composés	% inhibition de la croissance des oocystes		
	12,5 μM	25 μM	50 μM
Cipro	19,48 \pm 1,08	46,13 \pm 2,91	53,40 \pm 2,51
Cipro-Et	20,27 \pm 10,08	32,57 \pm 7,65	36,43 \pm 9,76
Cipro-Ad	24,68 \pm 8,35	34,22 \pm 3,77	Tox
Cipro-Bz	33,63 \pm 11,62	42,63 \pm 14,65	Tox
Cipro-Fc	26,20 \pm 4,80	31,83 \pm 3,77	Tox

Tableau 29 : Pourcentage d'inhibition de la croissance des oocystes en présence de la Cipro ou des prodrogues fluoroquinolones.

Toutes les molécules présentent des activités inhibitrices similaires aux doses de 12,5 μM et de 25 μM . Les CI_{50} ne sont calculables que pour la Cipro (39,2 μM) et pour la Cipro-Bz (57,4 μM). L'activité de la Cipro est du même ordre de grandeur que ce qui a été déterminé lors des tests d'activités chez *P. falciparum* et chez *T. gondii*. En revanche l'activité de la Cipro-Bz est de 22 à 180 fois plus faible chez *C. parvum*. Comparativement (entre la Cipro et la Cipro-Bz), la molécule la plus active chez les apicomplexes possédant un apicoplaste, est la molécule la moins active chez *C. parvum* qui ne possède pas d'apicoplaste.

A la dose de 50 μM , seules la Cipro et la Cipro-Et ne présentent pas de toxicité vis-à-vis des cellules hôtes. Néanmoins, il est important de noter que la toxicité de la Cipro-Ad, de la Cipro-Fc et de la Cipro-Bz n'est pas corrélée avec un nombre inférieur de parasites. En effet, le nombre de parasites est similaire à ce qui a été obtenu à la dose de 25 μM . La toxicité des molécules s'est manifestée par une proportion importante de cellules fusiformes et étirées, souvent isolées. Parmi les trois composés qui se sont révélés toxiques à la dose de 50 μM , la Cipro-Fc semble être le plus toxique pour les cellules.

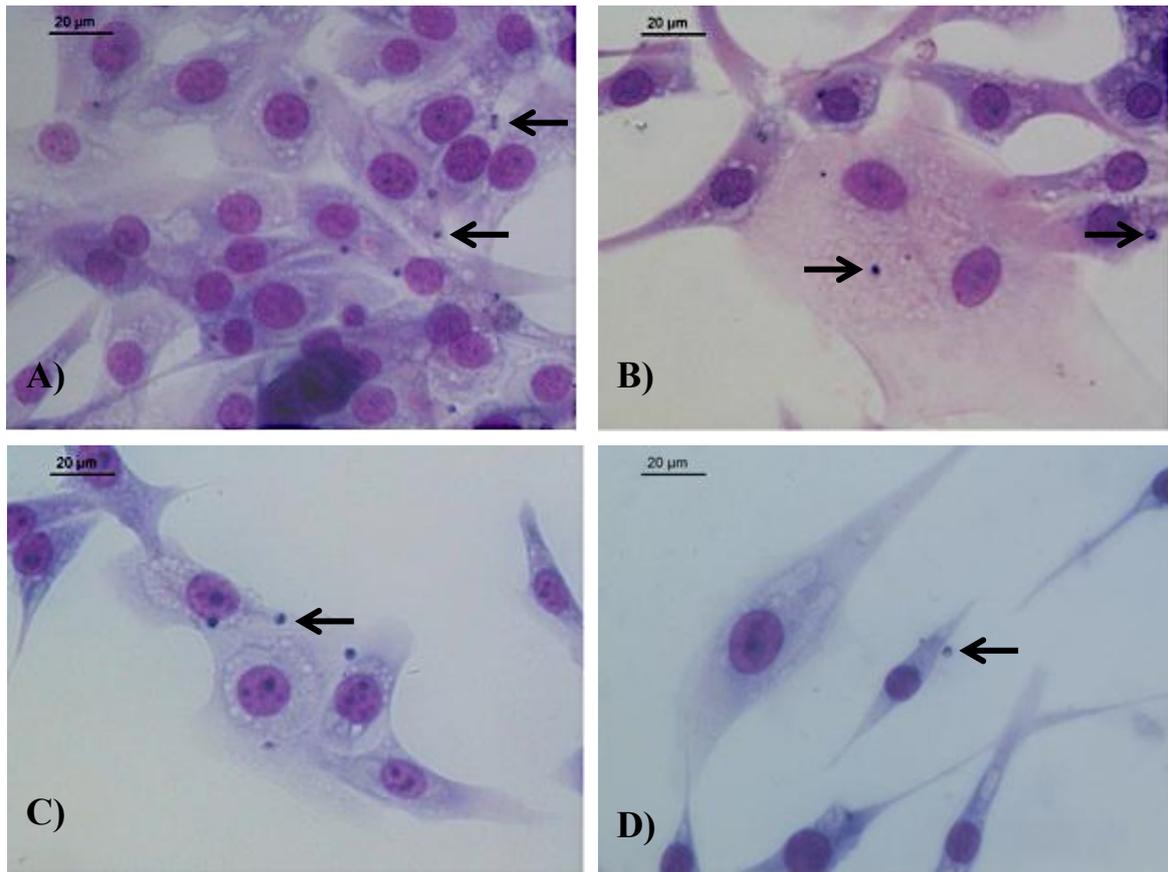


Figure 89 : Cellules MDBK infectées par *C. parvum*. A) Contrôle, les flèches montrent les trophozoïtes ; B) Traitées par la Cipro-Fc (50 µM) ; C) Traitées par la Cipro-Bz (50 µM) et D) Traitées par de la Cipro-Ad (50 µM).

Dans le contrôle, les cellules MDBK infectées par *C. parvum* sont sub-confluentes et le nombre de trophozoïtes est important (Figure 89, A). Dans les cellules MDBK infectées et traitées par de la Cipro-Fc à la dose de 50µM, le nombre de parasite est élevé mais les cellules sont peu nombreuses, présentent un cytoplasme plus foncé et un aspect fusiforme (Figure 89, B). Dans les cellules MDBK infectées et traitées par la Cipro-Bz, le nombre de parasites est important mais les cellules MDBK sont peu nombreuses (Figure 89, C). Dans les cellules MDBK infectées et traitées par la Cipro-Ad, les cellules MDBK présentent un aspect fusiforme important et sont peu nombreuses (Figure 89, D).

Ces données suggèrent que la cible de nos molécules serait bien l'apicoplaste. En effet, les prodrogues fluoroquinolones ne sont pas actives sur le parasite *C. parvum*, qui ne possède pas d'apicoplaste alors qu'elles présentent des activités au micromolaire chez *P. falciparum* et *T. gondii*, qui possèdent un apicoplaste.

II.8. Conclusions

In vitro, la Cipro-Ad et la Cipro-Bz présentent de bonnes activités antipaludiques et antitoxoplasmiques. La Cipro-Et et la Cipro-Fc présentent des activités légèrement inférieures mais qui restent néanmoins supérieures à celles obtenues pour la Cipro. La plus grande lipophilie des composés estérifiés serait à l'origine de leur activité sur *T. gondii* et sur *P. falciparum*. En effet, les homologues acides de ces molécules présentent un comportement hydrophile défavorable au passage membranaire, ce qui suggèrent que les esters seraient plus efficaces pour passer les nombreuses membranes de l'apicoplaste et seraient ainsi capables de s'accumuler plus fortement et plus rapidement. D'autre part, la substitution du noyau pipérazine par un benzyle ou un éthyladamantyle a permis une amélioration de l'activité des prodrogues *in vitro*. Nous avons suggéré que l'encombrement stérique engendré par l'ajout de ces groupements pourrait permettre une meilleure affinité des molécules envers la cible, toutefois, des études de docking ne nous ont pas permis d'établir de relation entre l'activité antitoxoplasmique et les énergies de liaison avec l'ADN gyrase de *T. gondii*. De plus, une étude de localisation de nos prodrogues dans le parasite n'a pu aboutir à cause d'une pollution dû au milieu de culture.

L'activité antitoxoplasmique *in vivo* de nos prodrogues a été déterminé sur des souris Swiss. De façon surprenante, la Cipro-Et est la molécule le plus efficace tandis que la Cipro-Bz et la Cipro-Ad ne permettent pas d'accéder à une survie de souris au-delà de 20 jours. Ces résultats sont en contradiction avec ce qui a été évalué *in vitro*. Les $\log P$ de la Cipro-Bz (4,35) et de la Cipro-Ad (5,25) montrent que ces composés sont hautement lipophiles. Cependant, il a été montré qu'à des valeurs de $\log P$ comprises entre 3 et 5, les molécules présentent une bonne perméabilité mais une absorption faible, en raison de leur potentielle faible solubilité.(10) La Cipro-Et possède une valeur de $\log P$ de 2,29. Les molécules possédant une valeur de $\log P$ comprise entre 1 et 3, ont généralement une bonne absorption intestinale, en raison d'un bon équilibre de la solubilité et de la perméabilité.(10) *In vitro*, les molécules sont mis en contact direct avec le milieu de culture contenant les cellules parasitées, de ce fait une bonne perméabilité est nécessaire pour interagir avec la cible. Les prodrogues substituées sur la pipérazine présentant des valeurs de lipophilie plus hautes, il était attendu d'avoir de meilleures activités. *In vivo*, un juste équilibre doit exister entre la solubilité et la lipophilie pour permettre une bonne absorption du composé. Les résultats nous montrent l'importance des tests sur modèle animal avant toute investigation future.

De manière toute à fait intéressante, ces molécules ne présentent pas d'activité sur *C. parvum*, un parasite apicomplexe qui ne possède pas d'apicoplaste. De plus, une étude ultrastructurale réalisée chez *T. gondii* nous a permis de montrer que nos prodrogues fluoroquinolones ont un impact sur la division de l'apicoplaste et engendrent la formation d'apicoplastes anormaux. Ces résultats suggèrent que l'apicoplaste serait bien la cible des prodrogues fluoroquinolones.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Dahl, E. L., et Rosenthal, P. J. (2008) Apicoplast translation, transcription and genome replication: targets for antimalarial antibiotics, *Trends Parasitol* 24, 279-84.
2. Fichera, M. E., et Roos, D. S. (1997) A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites, *Nature* 390, 407-409.
3. McFadden, G. I. (2010) The apicoplast, *Protoplasma*.
4. Drlica, K., et Malik, M. (2003) Fluoroquinolones: action and resistance, *curr top Med Chem* 3, 249-82.
5. Hooper, D. C. (2001) Mechanisms of action of antimicrobials: focus on fluoroquinolones, *Clin Infect Dis* 32 Suppl 1, S9-S15.
6. Divo, A. A., Sartorelli, A. C., Patton, C. L., et Bia, F. J. (1988) Activity of fluoroquinolone antibiotics against *Plasmodium falciparum* in vitro, *Antimicrob Agents Chemother* 32, 1182-6.
7. Anquetin, G., Greiner, J., et Vierling, P. (2005) Quinolone-based drugs against *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium* spp, *Curr Drug Targets Infect Disord* 5, 227-45.
8. Dahl, E. L., et Rosenthal, P. J. (2007) Multiple antibiotics exert delayed effects against the *Plasmodium falciparum* apicoplast, *Antimicrob Agents Chemother* 51, 3485-90.
9. Dubar, F., Anquetin, G., Pradines, B., Dive, D., Khalife, J., et Biot, C. (2009) Enhancement of the antimalarial activity of ciprofloxacin using a double prodrug/bioorganometallic approach, *J Med Chem* 52, 7954-7.
10. Kerns, E. H., et Di, L. (2008) Drug-like properties : concepts, structure design and methods : from ADME to toxicity optimization, Academic Press, Amsterdam; Boston.
11. Cook, C. S., Karabatsos, P. J., Schoenhard, G. L., et Karim, A. (1995) Species dependent esterase activities for hydrolysis of an anti-HIV prodrug glycovir and bioavailability of active SC-48334, *Pharm. Res.* 12, 1158-1164.
12. Chemaxon. <http://www.chemaxon.com>.
13. Pradines, B., Rogier, C., Fusai, T., Mosnier, J., Daries, W., Barret, E., et Parzy, D. (2001) In vitro activities of antibiotics against *Plasmodium falciparum* are inhibited by iron, *Antimicrob Agents Chemother* 45, 1746-50.
14. Pradines, B., Spiegel, A., Rogier, C., Tall, A., Mosnier, J., Fusai, T., Trape, J. F., et Parzy, D. (2000) Antibiotics for prophylaxis of *Plasmodium falciparum* infections: in vitro activity of doxycycline against Senegalese isolates, *Am J Trop Med Hyg* 62, 82-5.

15. Kehr, S., Sturm, N., Rahlfs, S., Przyborski, J. M., et Becker, K. (2010) Compartmentation of redox metabolism in malaria parasites, *PLoS Pathog* 6, e1001242.
16. Köhler, S., Delwiche, C. F., Denny, P. W., Tilney, L. G., Webster, P., Wilson, R. J., Palmer, J. D., et Roos, D. S. (1997) A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites, *Science* 275, 1485-1489.
17. Goodman, C. D., Su, V., et McFadden, G. I. (2007) The effects of anti-bacterials on the malaria parasite *Plasmodium falciparum*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 152, 181-191.
18. Ralph, S. A., D'Ombrian, M. C., et McFadden, G. I. (2001) The apicoplast as an antimalarial drug target, *Drug Resist. Updat.* 4, 145-151.
19. McFadden, G. I., et Roos, D. S. (1999) Apicomplexan plastids as drug targets, *Trends Microbiol.* 7, 328-333.
20. Williamson, D. H., Preiser, P. R., Moore, P. W., McCready, S., Strath, M., et Wilson, R. J. M. (2002) The plastid DNA of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* is replicated by two mechanisms, *Mol. Microbiol.* 45, 533-542.
21. Dubar, F., Wintjens, R., Martins-Duarte, É. S., Vommaro, R. C., de Souza, W., Dive, D., Pierrot, C., Pradines, B., Wohlkonig, A., Khalife, J., et Biot, C. (2011) Ester prodrugs of ciprofloxacin as DNA-gyrase inhibitors: synthesis, antiparasitic evaluation and docking studies, *MedChemComm* 2, 430.
22. Bax, B. D., Chan, P. F., Eggleston, D. S., Fosberry, A., Gentry, D. R., Gorrec, F., Giordano, I., Hann, M. M., Hennessy, A., Hibbs, M., Huang, J., Jones, E., Jones, J., Brown, K. K., Lewis, C. J., May, E. W., Saunders, M. R., Singh, O., Spitzfaden, C. E., Shen, C., Shillings, A., Theobald, A. J., Wohlkonig, A., Pearson, N. D., et Gwynn, M. N. (2010) Type IIA topoisomerase inhibition by a new class of antibacterial agents, *Nature* 466, 935-40.
23. Wohlkonig, A., Chan, P. F., Fosberry, A. P., Homes, P., Huang, J., Kranz, M., Leydon, V. R., Miles, T. J., Pearson, N. D., Perera, R. L., Shillings, A. J., Gwynn, M. N., et Bax, B. D. (2010) Structural basis of quinolone inhibition of type IIA topoisomerases and target-mediated resistance, *Nat Struct Mol Biol* 17, 1152-3.
24. Huey, R., Morris, G. M., Olson, A. J., et Goodsell, D. S. (2007) A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation, *J Comput Chem* 28, 1145-52.
25. Kaulich, B., Gianoncelli, A., Beran, A., Eichert, D., Kreft, I., Pongrac, P., Regvar, M., Vogel-Mikus, K., et Kiskinova, M. (2009) Low-energy X-ray fluorescence microscopy opening new opportunities for bio-related research, *J R Soc Interface* 6 Suppl 5, S641-647.

CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale

Mes travaux de thèse ont reposé sur deux objectifs principaux, d'une part la compréhension du mécanisme d'action de la FQ et d'autre part, la compréhension du mécanisme d'action d'analogues de la ciprofloxacine.

Dans le chapitre deux, nous avons synthétisé des analogues de la FQ pour tenter de mieux comprendre son mécanisme d'action. Tout d'abord, nous nous sommes intéressés à l'étude de leurs propriétés physico-chimiques. La possibilité de former une liaison hydrogène intramoléculaire permet à la FQ d'avoir une bonne perméabilité membranaire grâce à la formation d'une conformation particulière au pH cytosolique. En effet, à ce pH, la molécule possède une proportion non négligeable de sa forme neutre, lui permettant ainsi d'adopter une conformation repliée qui favoriserait le passage membranaire. Au pH vacuolaire, la molécule est majoritairement sous forme diprotonée, générant ainsi une conformation ouverte chargée, qui ne serait pas capable de traverser la membrane de la vacuole digestive, empêchant ainsi l'efflux de la molécule.

D'autre part, nous avons montré que la FQ-Me, qui n'est pas capable de former de liaison hydrogène intramoléculaire, posséderait un mécanisme d'action et/ou de résistance similaire à la CQ. Il a été montré que l'activité de la FQ n'est pas corrélée avec le polymorphisme des gènes impliqués dans la résistance aux quinoléines antipaludiques, suggérant ainsi que les protéines de transport impliquées dans ces résistances ne seraient pas capables de prendre en charge la FQ.

L'utilisation de la RQ comme traceur froid, nous a permis de montrer que la FQ s'accumule préférentiellement dans les hématies parasitées par rapport aux hématies saines. De plus, l'accumulation dans les hématies parasitées atteint très vite un équilibre. D'autre part, l'absence de la liaison hydrogène intramoléculaire engendre une diminution de la cinétique d'accumulation, suggérant que cette liaison est essentielle à une accumulation rapide et efficace de la RQ, donc de la FQ, à l'intérieur du compartiment vacuolaire.

Nous avons étudié la localisation de la RQ par microscopie électronique et par fluorescence des rayons X par rayonnement synchrotron. Ces expériences nous ont permis de montrer que la RQ s'accumulerait dans la vacuole digestive à proximité du pigment malarique et à proximité des membranes. La co-localisation des atomes de ruthénium et de chlore nous

ont permis de démontrer que la RQ est intacte dans le compartiment vacuolaire et que l'atome de chlore peut être utilisé directement comme élément traceur des molécules antipaludiques. Ainsi, la localisation de la FQ et de la CQ a été réalisée et nous a permis de mettre en évidence une différence importante dans la localisation de ces deux molécules. Dans les souches CQ-sensibles, la CQ présente une accumulation diffuse sur l'ensemble du parasite alors que la FQ s'accumule nettement dans la vacuole digestive du parasite. Dans les souches CQ-résistantes, la CQ n'est pas détectée dans la vacuole digestive ce qui est en accord avec la littérature et démontre l'efflux de cette molécule. Ces données suggèrent que la FQ agirait au niveau de la vacuole digestive où elle inhiberait la croissance du pigment malarique. Des études de modélisation moléculaire ont été menées et nous ont permis d'étudier les interactions de la FQ avec l'hémozoïne (synthétique). Nous avons montré que la FQ se lierait aux faces {001} et {100} du cristal de β -hématine. La FQ pourrait interagir sous sa forme diprotonée grâce au transfert de protons possible entre les acides propioniques du pigment malarique et le groupe amine basique de la FQ.

La FQ et la FQ-Me sont capables de générer la production de radicaux HO[°] par des réactions de type Fenton, dans les conditions de la vacuole digestive. L'introduction d'un groupement méthyle sur l'azote N11 ne modifierait pas les propriétés rédox de la molécule puisque les deux molécules produiraient la même quantité de radicaux HO[°]. L'activité de la FQ-Me étant plus faible que celle de la FQ, il a été suggéré que l'accumulation modérée de cette molécule dans la vacuole digestive expliquerait cette diminution d'activité. De plus, l'utilisation d'une sonde spécifique des radicaux hydroxyles a permis de montrer que contrairement à la CQ, la FQ engendre une augmentation des mécanismes rédox à l'intérieur du parasite, notamment une augmentation de la production des radicaux HO[°] dans la vacuole digestive. Des études d'ultrastructure ont montré qu'en présence de FQ la membrane de la vacuole digestive présente des altérations importantes et qu'une diminution de la taille des cristaux d'hémozoïne est observée. Malgré les propriétés rédox de la FQ-Me, les altérations observées sont plus faibles, démontrant que l'accumulation de la FQ est un facteur important dans son activité antipaludique.

Le mécanisme d'action de la FQ est un mécanisme complexe. L'amélioration du passage membranaire permet à la FQ de s'accumuler dans la vacuole digestive du parasite. Ce passage membranaire est amélioré notamment grâce à son caractère lipophile et à la présence d'une liaison hydrogène intramoléculaire qui permet un passage aisé entre les formes neutre,

monoprotonée et diprotonée. Les propriétés rédox apportées par le groupement Fc, permettent à la FQ d'engendrer de graves dommages au parasite, notamment à la membrane du compartiment vacuolaire, ce qui pourrait précipiter la mort du parasite. La FQ n'est donc pas une CQ-like et possède un mécanisme d'action original complexe différent de celui de la CQ.

Le troisième chapitre de cette thèse a été consacré à l'étude du mécanisme d'action de fluoroquinolones. Récemment, nous avons montré qu'une approche prodrogue couplée à l'introduction d'un groupement Fc, permet l'amélioration de l'activité antipaludique d'analogues de la Cipro. Nous avons synthétisé de nouveaux analogues prodrogues organiques de ces molécules, afin d'étudier l'apport engendré par l'introduction du Fc. Les activités antipaludiques et antitoxoplasmiques *in vitro* de la Cipro-Ad et de la Cipro-Bz sont plus hautes que celles déterminées pour la Cipro-Et et la Cipro-Fc. Tous les analogues prodrogues possèdent néanmoins une meilleure activité que la Cipro. Cette amélioration d'activité serait donc due à la plus grande lipophilie de ces composés estérifiés. En effet, l'étude des propriétés physico-chimiques des différentes molécules a permis de montrer que le comportement hydrophile de leurs homologues acide serait défavorable au passage membranaire. Le passage membranaire serait donc facilité dans le cas des esters prodrogues, ce qui permettrait une accumulation plus rapide. L'activité *in vitro* des molécules a été augmentée par la substitution du noyau pipérazine par un benzyle ou un éthyladamantyle, suggérant que l'encombrement stérique, engendré par l'ajout de ces groupements, pourrait permettre une meilleure affinité des molécules envers la cible. Des études de docking ont donc été menées pour calculer les énergies d'interaction des différentes molécules avec le site d'action présumé, l'ADN gyrase de *P. falciparum* ou *T. gondii*. Toutefois ces études ne nous ont pas permis d'établir de relation entre l'activité antitoxoplasmique et les énergies de liaison. D'autre part, une étude de localisation de nos prodrogues dans le parasite n'a pu aboutir à cause d'une pollution due au milieu de culture.

In vivo, l'activité antitoxoplasmique de nos prodrogues a été déterminée sur des souris Swiss. Contrairement à ce qui avait été observé *in vitro*, la Cipro-Et est la molécule la plus active. La Cipro-Bz et la Cipro-Ad ne permettant pas d'accéder à une survie de souris au-delà de 20 jours. La haute lipophilie de la Cipro-Bz et de la Cipro-Ad permettrait une amélioration du passage membranaire mais limiterait la solubilité des molécules et donc engendrerait une absorption faible. Ces résultats montrent l'intérêt des tests *in vivo* et démontrent que la lipophilie est un paramètre essentiel dans le développement de nouveaux composés. De plus,

aucune activité n'a été décelée chez *C. parvum*, un parasite apicomplexe ne possédant pas d'apicoplaste, la cible présumée de nos molécules. D'autre part, chez *T. gondii*, nous avons montré que nos analogues prodrogues engendrent des anomalies de la division apicoplastique chez le parasite. Tout ceci suggèrent que nos molécules agiraient au niveau de l'apicoplaste des apicomplexes.

En résumé, ces travaux de thèse ont permis d'améliorer notre compréhension dans le mécanisme d'action de la FQ. Nous avons pu démontrer que son activité est due à la fois à sa structure particulière, à sa localisation préférentielle qui lui permettrait d'interagir avec les faces en croissance du pigment malarique et à ses propriétés physico-chimique, notamment sa capacité à engendrer une augmentation de la production de radicaux hydroxyles dans la vacuole digestive du parasite, entraînant ainsi la lyse de la membrane vacuolaire puis *in fine* la mort du parasite.

Les travaux sur les analogues de la Cipro nous ont permis de montrer que ces molécules possèdent une bonne activité sur *P. falciparum* et sur *T. gondii* mais pas sur *C. parvum*, suggérant que la cible thérapeutique serait bien l'apicoplaste. Des études d'ultrastructure chez *T. gondii* permettent de renforcer nos conclusions. Une étude *in vivo* a montré que l'analogue ne possédant pas de substitution sur le noyau pipérazine est le plus efficace, suggérant que les analogues substitués sur la pipérazine et qui donc possèdent une plus grande lipophilie, ne seraient pas suffisamment soluble pour présenter une bonne absorption.

CHAPITRE IV

PARTIE EXPERIMENTALE

Partie expérimentale

Les points de fusion ont été déterminés à l'aide d'un banc Kopfler et n'ont pas été corrigés.

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C ont été enregistrés à température ambiante sur un spectromètre Bruker AC 300 et le tétraméthylsilane (TMS) a été utilisé comme référence interne. Les analyses ^1H ont été obtenues à 300 MHz, les analyses ^{13}C ont été obtenues à 75,4 MHz, les analyses ^{14}N ont été obtenues à 40,6 MHz et ^{19}F ont été obtenues à 282 MHz. Les déplacements chimiques δ sont donnés en parties par million par rapport au TMS ($\delta = 0,00$). Différents solvants deutérés ont été utilisés suivant la solubilité des produits. Pour les spectres ^1H , les abréviations s, d, t, q, dd, sd et m se réfèrent à des signaux sous forme de singulet, doublet, triplet, quadruplet, doublet dédoublé, singulet dédoublé et multiplet. Pour les spectres ^{13}C , les abréviations C^{IV} , CH, CH_2 et CH_3 sont utilisées pour désigner les carbones quaternaires, tertiaires, secondaires et primaires.

Les spectres de masse ont été enregistrés sur un spectromètre de masse Waters Micromass Quattro II triple quadrupole LC équipé d'une ionisation électrospray (ESI) et de sources d'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) ou sur un spectromètre de masse Ultima Micromass MALDI QTOF.

Les produits ont été purifiés par colonne chromatographique sur gel de silice (Merck Kieselgel 60) ou sur système chromatographique flash utilisant des colonnes pré-paquées Puriflash (Interchim).

Les réactions ont été suivies par chromatographie sur couche mince de gel de silice Macherey-Nagel Polygram Sil G/UV₂₅₄ et les produits ont été détectés sous lampe UV à 254 nm ou 366 nm.

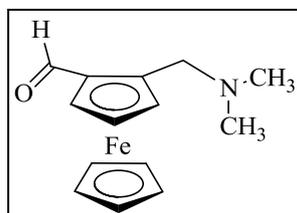
La pureté des produits a été déterminée par analyses élémentaires par Catherine Méliet et son assistance (UCCS, Université Lille 1) sur un analyseur élémentaire ELEMENTAR varioMICRO cube (financé par la Région Nord Pas de Calais et le PRIM SP).

Le dépôt des cultures sur les supports en nitrure de silicium ont été réalisés dans le laboratoire du Dr Jamal Khalife de l'Institut Pasteur de Lille. La mise en contact des cultures de *P.*

falciparum avec le produit traceur de radicaux $\text{H}_2\text{O}^\bullet$ a été effectuée dans le laboratoire du Pr Philippe Grellier au Muséum Nationale d'Histoire Naturelle. Les expériences de microscopie ont été réalisées dans le laboratoire du Dr Christian Slomianny du Laboratoire de Physiologie Cellulaire (Université Lille 1).

Synthèses

Etude du mécanisme d'action de la Ferroquine

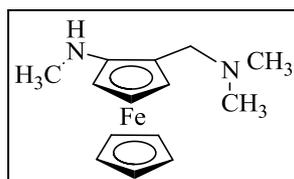
2-[(*N,N*-diméthylamino)méthyl]ferrocènealdéhyde

Sous N_2 et sous agitation, la *N,N*-diméthyl-1-ferrocénylméthanamine (1,02 g, 4,2 mM) est dissous dans 40 mL d'éther diéthylique anhydre, puis la solution est refroidie à 0°C. Le *t*-BuLi (1,7 M dans le pentane) (3,6 mL, 6,1 mM) est ajouté goutte à goutte en maintenant la température à 0 °C, le mélange est agité 20 min. Le diméthylformamide (0,72 mL, 8,6 mM) est ajoutée, puis le mélange est agité durant 10 min en maintenant la température à 0 °C. Le mélange est hydrolysé (20 mL d'eau) puis est extrait avec de l'éther diéthylique (3x20 mL). Les phases organiques sont rassemblées, puis séchées sur $MgSO_4$. Après filtration, les solvants sont évaporés sous pression réduite. Le produit obtenu est purifié sur colonne chromatographique de silice avec comme éluant un mélange d'acétate d'éthyle/éther de pétrole (7:3) puis en suivant un gradient jusqu'à un mélange d'acétate d'éthyle/éther de pétrole/triéthylamine (7:2:1). Les solvants des fractions correspondantes au produit sont évaporés sous pression réduite. Une huile rouge foncé est obtenue (1,024 g, 3,78 mM).

Rendement : 90% ; **Aspect :** huile rouge foncée ; **Formule brute :** $C_{14}H_{17}NOFe$; **Masse molaire :** 271,07 g/mol ; **m/z** 271 M^+ , 256 $(M-CH_3)^+$, 242 $(M-CHO)^+$, 227 $(M-N(CH_3)_2)^+$, 198 $(M-(N(CH_3)_2 + CHO))^+$; 163 $(M-(HN(CH_3)_2 + Cp))^+$; 121 $CpFe^+$; 95 $C_3H_3Fe^+$; 58 $CH_2N(CH_3)_2^+$; 56 Fe^+ .

RMN 1H ($CDCl_3$) : 10,10 ppm : s, 1H, CHO ; 4,81 ppm : m, 1H, Cp ; 4,61 ppm : m, 1H, Cp ; 4,56 ppm : m, 1H, Cp ; 4,21 ppm : s, 5H, Cp' ; 3,85 ppm : d ($J = 13,1$ Hz), 1H, CH_2NMe_2 ; 3,35 ppm : d ($J = 13,1$ Hz), 1H, CH_2NMe_2 ; 2,23 ppm : s, 6H, 2 CH_3 .

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : 176,3 ppm : CHO ; 83,2 ppm : C^{IV} ; 78,0 ppm : C^{IV} ; 75,3 ppm : CH Cp ; 73,2 ppm : CH Cp ; 71,6 ppm : CH Cp' ; 69,7 ppm : CH Cp ; 59,3 ppm : CH_2 ; 44,1 ppm : CH_3 .

***N,N*-diméthyl-1-{3-[(méthylamino)méthyl]ferrocényl}méthanamine**

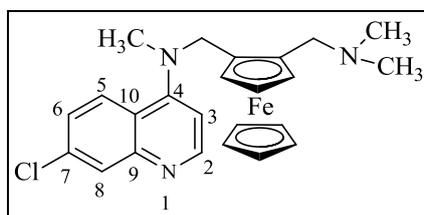
Le 2-[(*N,N*-diméthylamino)méthyl]ferrocèncarbaldéhyde (0,756 g, 2,8 mM) est dissous dans 50 mL de THF anhydre. A cette solution est ajouté, du chlorhydrate de méthylamine (0,942 g ; 13,9 mM) et du K_2CO_3 (2,695 g ; 19,5 mM). La réaction est abandonnée à température ambiante, sous agitation durant 1h30. Le THF est évaporé sous pression réduite et l'huile résultante est dissoute dans du méthanol anhydre. A 0°C du $NaBH_4$ (0,106 g, 2,8 mM) est ajouté, puis le mélange est laissé sous agitation durant 20 min. Il est alors hydrolysé puis extrait avec de l'éther diéthylique (2 x 20 mL). Les phases organiques sont rassemblées puis séchées sur $MgSO_4$. Après filtration, les solvants sont évaporés sous pression réduite. Une huile marron est obtenue (0,793 g, 2,8 mM).

Rendement : 99% ; **Aspect :** huile marron ; **Formule brute :** $C_{15}H_{22}N_2Fe$; **Masse molaire :** 286,10 g/mol ; **m/z** 287 MH^+ .

RMN 1H ($CDCl_3$) : 4,22 ppm : s, 1H, Cp ; 4,14 ppm : s, 1H, Cp ; 4,07 ppm : s, 5H, Cp' ; 4,06 ppm : s, 1H, Cp ; 3,80 ppm : d ($J = 13,2$ Hz), 1H, CH_2NHMe ; 3,65 ppm : d ($J = 12,3$ Hz), 1H, CH_2NHMe ; 3,34 ppm : d ($J = 13,4$ Hz), 1H, CH_2NMe_2 ; 2,85 ppm : d ($J = 12,2$ Hz), 1H, CH_2NMe_2 ; 2,38 ppm : s, 3H, CH_3 ; 2,14 ppm : s, 6H, $2CH_3$.

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : 85 ppm : C^{IV} ; 83,6 ppm : C^{IV} ; 71,0 ppm : CH ; 70,1 ppm : CH ; 69,0 ppm : 5CH ; 66,1 ppm : CH ; 58,0 ppm : CH_2 ; 49,5 ppm : CH_2 ; 44,9 ppm : $2CH_3$; 35,1 ppm : CH_3 .

7-chloro-4-{*N*-méthyl-[2-(*N,N*'-diméthylaminométhyl)-*N*-ferrocénylméthylamino]}-quinoléine ou ferroquine méthylée (FQ-Me)



La [2-(*N,N*-diméthylaminométhyl)ferrocényl]méthylamine (1g, 3,6 mM) est mélangée avec de la 4,7-dichloroquinoléine (3,564 g, 18,0 mM), de la triéthylamine (6,962 g, 68,8 mM), du K_2CO_3 (1,973 g ; 14,3 mM) dans de la *N*-méthyl-2-pyrrolidone (25,0 mL). Le mélange est chauffé à 135°C sous N_2 durant 6h. Le mélange est refroidi à température ambiante. La phase organique est extraite avec une solution d'acide citrique (5%), puis la phase aqueuse obtenue est neutralisée par K_2CO_3 jusqu'à pH basique en présence de dichlorométhane. La phase organique est lavée par une solution saturée en NaCl. Après séchage de la phase organique sur Na_2SO_4 , les solvants sont évaporés sous pression réduite. Le produit obtenu est purifié sur colonne chromatographique de silice avec comme éluant un mélange d'acétate d'éthyle/éther de pétrole (8:2) puis en suivant un gradient jusqu'à un mélange d'acétate d'éthyle/éther de pétrole/triéthylamine (7:2:1). Les solvants des fractions correspondantes au produit sont évaporés sous pression réduite. Une huile marron est obtenue (1,047 g, 2,3 mM).

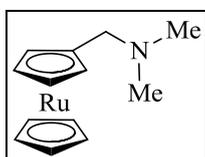
Rendement : 65% ; **Aspect :** huile marron ; **Formule brute :** $C_{24}H_{26}ClN_3Fe$; **Masse molaire :** 447,5 g/mol ; **m/z** 450 $MH^+ ^{37}Cl$, 448 $MH^+ ^{35}Cl$, 405 ($M ^{37}Cl - NMe_2$)⁺, 403 ($M ^{37}Cl - NMe_2$)⁺. **Analyse élémentaire :** (C, H, N) Calculée : C 64,37 %, H 5,85 %, N 9,38 % ; Mesurée : C 63,96 %, H 5,82 %, N 9,41 %.

RMN 1H ($CDCl_3$) : 8,63 ppm : d ($J = 5,2$ Hz), 1H, CH ; 8,05 ppm : d ($J = 9,1$ Hz), 1H, CH ; 8,02 ppm : d ($J = 2,0$ Hz), 1H, CH ; 7,38 ppm : dd ($J = 2,2$ et 8,9 Hz), 1H, CH ; 6,79 ppm : d ($J = 5,3$ Hz), 1H, CH ; 4,39 ppm : m, 2H, CH_2 ; 4,22 ppm : m, 2H, Cp ; 4,11 ppm : m, 1H, Cp ; 4,05 ppm : s, 5H, Cp' ; 3,31 ppm : d ($J = 12,9$ Hz), 1H, CH_2 ; 3,10 ppm : d ($J = 12,9$ Hz), 1H, CH_2 ; 2,91 ppm : s, 3H, CH_3 ; 2,08 ppm : m, 6H, $2CH_3$.

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : 157,3 ppm : C^{IV} ; 151,6 ppm : CH ; 150,6 ppm : C^{IV} ; 134,8 ppm : C^{IV} ; 128,8 ppm : CH ; 126,1 ppm : CH ; 125,4 ppm : CH ; 121,9 ppm : C^{IV} ; 108,8 ppm : CH ;

83,4 ppm : C^{IV} ; 83,2 ppm : C^{IV} ; 71,1 ppm : CH ; 70,1 ppm : CH ; 69,6 ppm : 5CH ; 67,1 ppm : CH ; 57,7 ppm : CH₂ ; 54,1 ppm : CH₂ ; 45,2 ppm : 2CH₃ ; 40,5 ppm : CH₃.

N,N-diméthyl-1-ruthénocénylméthanamine



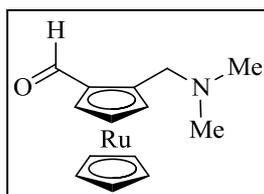
Le ruthénocène (1 g, 4,33 mM) est mis en suspension dans un mélange d'acide acétique glacial (13 mL, 0,22 mM) et d'acide phosphorique (1,3 mL, 19 mM), puis la *N,N,N',N'*-tétraméthylméthylènediammine (1,2 mL, 8,66 mM) est ajoutée. Le ballon est bouché et la solution est chauffée à 120 °C durant 12h. Le mélange est refroidi à température ambiante puis il est hydrolysé avec de l'eau distillée (5 mL), puis lavé avec de l'éther diéthylique (20 mL). La phase organique est extraite avec de l'eau distillée (20 mL). Les phases aqueuses sont rassemblées puis refroidies à 0 °C avant d'être neutralisées avec de la soude en pastille (jusqu'à pH = 8-10). La phase aqueuse est extraite avec du dichlorométhane (3x20 mL). Les phases organiques sont rassemblées, puis séchées sur MgSO₄. Après filtration, les solvants sont évaporés sous pression réduite.

Le produit obtenu est purifié sur colonne chromatographique de silice avec comme éluant un mélange d'éther diéthylique/éther de pétrole (5:5) puis en suivant un gradient jusqu'à un mélange éther diéthylique/triéthylamine (99:1).

Rendement : 71% ; **Aspect :** huile beige ; **Formule brute :** C₁₃H₁₇NRu ; **Masse molaire :** 289,04 g/mol ; **m/z** 291 : M⁺ ¹⁰⁴Ru, 289 : M⁺ ¹⁰²Ru, 288 : M⁺ ¹⁰¹Ru, 287 : M⁺ ¹⁰⁰Ru, 286 : M⁺ ⁹⁹Ru, 285 : M⁺ ⁹⁸Ru, 283 : M⁺ ⁹⁶Ru, 247 : (M-NMe₂)⁺ ¹⁰⁴Ru, 245 : (M-NMe₂)⁺ ¹⁰²Ru, 244 : (M-NMe₂)⁺ ¹⁰¹Ru, 243 : (M-NMe₂)⁺ ¹⁰⁰Ru, 242 : (M-NMe₂)⁺ ⁹⁹Ru, 241 : (M-NMe₂)⁺ ⁹⁸Ru, 239 : (M-NMe₂)⁺ ⁹⁶Ru, 169 : Cp¹⁰⁴Ru⁺, 167 : Cp¹⁰²Ru⁺, 166 : Cp¹⁰¹Ru⁺, 165 : Cp¹⁰⁰Ru⁺, 164 : Cp⁹⁹Ru⁺, 163 : Cp⁹⁸Ru⁺, 161 : Cp⁹⁶Ru⁺, 58 : ⁺CH₂NMe₂.

RMN ¹H (CDCl₃) : 4,59 ppm : m, 2H, Cp ; 4,54 ppm : s, 2H, Cp ; 4,51 ppm : s, 5H, Cp' ; 3,09 ppm : s, 2H, CH₂Nme₂ ; 2,17 ppm : s, 6H, CH₃.

RMN ¹³C (CDCl₃) : 86,9 ppm : C^{IV} ; 72,4 ppm : CH Cp ; 70,5 ppm : CH Cp' ; 70,2 ppm : CH Cp ; 58,9 ppm : CH₂ ; 44,7 ppm : CH₃.

2-[(*N,N*-diméthylamino)méthyl]ruthénocènealdéhyde

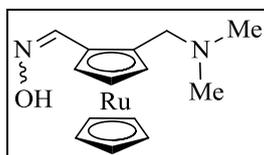
Sous N_2 et sous agitation, la *N,N*-diméthyl(ruthénocénylméthyl)amine (1,316 g, 4,5 mM) est dissoute dans 150 mL d'éther diéthylique anhydre, puis la solution est refroidie à 0°C. Le *t*-BuLi (1,7 M dans le pentane) (5,35 mL, 9 mM) est ajouté goutte à goutte en maintenant la température à 0 °C, le mélange est agité 20 min. La DMF (2,12 mL, 27 mM) est ajoutée. Puis le mélange est agité durant 10 min en maintenant la température à 0 °C. Le mélange est ensuite hydrolysé (20 mL d'eau) puis est extrait avec de l'éther diéthylique (3x20 mL). Les phases organiques sont rassemblées, puis séchées sur $MgSO_4$. Après filtration, les solvants sont évaporés sous pression réduite. Le produit obtenu est purifié sur colonne chromatographique de silice avec comme éluant un mélange d'acétate d'éthyle/éther de pétrole (7:3) puis en suivant un gradient jusqu'à un mélange d'acétate d'éthyle/éther de pétrole/triéthylamine (7:2:1).

Rendement : 82% ; **Aspect :** huile jaune ; **Formule brute :** $C_{14}H_{17}NORu$; **Masse molaire :** 316,36 g/mol ; **m/z** 319 : $M^{+104}Ru$, 317 : $M^{+102}Ru$, 316 : $M^{+101}Ru$, 315 : $M^{+100}Ru$, 314 : $M^{+99}Ru$, 313 : $M^{+98}Ru$, 311 : $M^{+96}Ru$, 304 : $(M-CH_3)^{+104}Ru$, 302 : $(M-CH_3)^{+102}Ru$, 301 : $(M-CH_3)^{+101}Ru$, 300 : $(M-CH_3)^{+100}Ru$, 299 : $(M-CH_3)^{+99}Ru$, 298 : $(M-CH_3)^{+98}Ru$, 296 : $(M-CH_3)^{+96}Ru$, 290 : $(M-CHO)^{+104}Ru$, 288 : $(M-CHO)^{+102}Ru$, 287 : $(M-CHO)^{+101}Ru$, 286 : $(M-CHO)^{+100}Ru$, 285 : $(M-CHO)^{+99}Ru$, 284 : $(M-CHO)^{+98}Ru$, 282 : $(M-CHO)^{+96}Ru$, 275 : $(M-NMe_2)^{+104}Ru$, 273 : $(M-NMe_2)^{+102}Ru$, 272 : $(M-NMe_2)^{+101}Ru$, 271 : $(M-NMe_2)^{+100}Ru$, 270 : $(M-NMe_2)^{+99}Ru$, 269 : $(M-NMe_2)^{+98}Ru$, 267 : $(M-NMe_2)^{+96}Ru$, 169 : $Cp^{104}Ru^+$, 167 : $Cp^{102}Ru^+$, 166 : $Cp^{101}Ru^+$, 165 : $Cp^{100}Ru^+$, 164 : $Cp^{99}Ru^+$, 163 : $Cp^{98}Ru^+$, 161 : $Cp^{96}Ru^+$, 58 : $^+CH_2NMe_2$.

RMN 1H ($CDCl_3$) : 9,89 ppm : s, 1H, CHO ; 5,06 ppm : m, 1H, Cp ; 4,90 ppm : s, 1H, Cp ; 4,81 ppm : m, 1H, Cp ; 4,61 ppm : s, 5H, Cp' ; 3,66 ppm : d (J = 13,14 Hz), 1H, $CH_2N(CH_3)_2$; 3,15 ppm : d (J = 13,14 Hz), 1H, $CH_2N(CH_3)_2$; 2,25 ppm : s, 6H, CH_3 .

RMN ^{13}C (CDCl_3) : 190,0 ppm : CHO ; 88,9 ppm : C^{IV} ; 83,3 ppm C^{IV} ; 77,2 ppm : CH Cp ; 73,1 ppm : CH Cp ; 72,6 ppm : CH Cp' ; 71,9 ppm : CH Cp ; 56,4 ppm : CH_2 ; 44,8 ppm : CH_3 .

Oxime de la 2-[(*N,N*-diméthylamino)méthyl]ruthénocèncarbaldéhyde



Le 2-((*N,N*-diméthylamino)méthyl)ruthénocèncarbaldéhyde (1,586 g, 5,0 mM) est dissous dans 50 mL d'éthanol absolu. A cette solution est ajoutée une solution aqueuse (2 mL) de soude (0,602 g, 15,1 mM). Le mélange est placé à reflux (78 °C) sous agitation durant 2h.

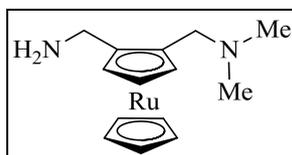
Puis, le mélange est refroidi à température ambiante, et hydrolysé (20 mL d'eau), 50 mL dichlorométhane sont ajoutés. Le mélange est ensuite neutralisé en faisant buller du CO_2 gazeux jusqu'à pH neutre. Le mélange est ensuite extrait par du dichlorométhane (3x50 mL). Les phases organiques sont rassemblées, puis séchées sur MgSO_4 . Après filtration, les solvants sont évaporés sous pression réduite. Le produit obtenu est purifié sur colonne chromatographique de silice avec comme éluant un mélange d'acétate d'éthyle/éther de pétrole (5:5) puis en suivant un gradient jusqu'à un mélange d'acétate d'éthyle/éther de pétrole/triéthylamine (5:4,5:0,5).

Rendement : 78% ; **Aspect :** semi-solide beige ; **Formule brute :** $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{ORu}$; **Masse molaire :** 331,38 g/mol ; **m/z** 334 : M^{+104}Ru , 332 : M^{+102}Ru , 331 : M^{+101}Ru , 317 : $(\text{M-OH})^{+104}\text{Ru}$, 316 : $(\text{M-OH})^{+102}\text{Ru}$, 315 : $(\text{M-OH})^{+101}\text{Ru}$, 290 : $(\text{M-CHNOH})^{+104}\text{Ru}$, 288 : $(\text{M-CHNOH})^{+102}\text{Ru}$, 287 : $(\text{M-CHNOH})^{+101}\text{Ru}$, 273 : $(\text{M-NMe}_2\text{-OH})^{+104}\text{Ru}$, 271 : $(\text{M-NMe}_2\text{-OH})^{+102}\text{Ru}$, 270 : $(\text{M-NMe}_2\text{-OH})^{+101}\text{Ru}$.

RMN ^1H (CDCl_3) : 7,89 ppm : s, 1H, CH=N ; 4,95 ppm : s, 1H, Cp ; 4,72 ppm : m, 1H, Cp ; 4,61 ppm : s, 1H, Cp ; 4,53 ppm : s, 5H, Cp' ; 3,59 ppm : d (J = 13,02 Hz), 1H, CH_2NMe_2 ; 3,11 ppm : d (J = 12,90 Hz, 1H, CH_2NMe_2 ; 2,79 ppm : d (J = 12,80 Hz), 1H, CH_2ND_2 ; 2,26 ppm : s, 6H, CH_3 .

RMN ^{13}C (CDCl_3) : 146,6 ppm : CH=N ; 85,2 ppm : C^{IV} ; 80,9 ppm : C^{IV} ; 73,9 ppm : CH Cp ; 71,2 ppm : CH Cp ; 70,1 ppm : CH Cp ; 69,1 : CH Cp' ; 56,1 ppm : CH_2 ; 44,1 ppm : CH_3 .

1-[2-(aminométhyl)ruthénocényl]-*N,N*-diméthylméthanamine



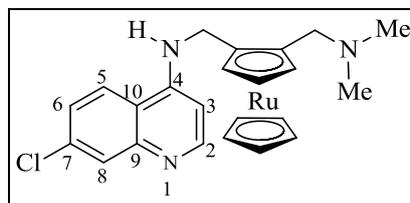
Sous N_2 , 0,422 g (11,1 mM) de LiAlH_4 sont mis en suspension dans 10 mL de THF anhydre. Sous N_2 , l'oxime de la 2-(*N,N*-diméthylamino)méthyl)ruthénocèncarbaldéhyde (0,821 g, 2,48 mM) est dissoute dans 10 mL de THF anhydre, puis cette solution est ajoutée goutte à goutte à la suspension de LiAlH_4 . Le mélange est porté à reflux durant 4h et sous agitation. Après refroidissement, 20 mL d'éther diéthylique sont ajoutés, puis le milieu est hydrolysé (20 mL). Les phases organiques et aqueuses sont séparées. Puis la phase aqueuse est extraite avec de l'éther diéthylique (2 x 15 mL). Les phases organiques sont rassemblées, puis séchées sur MgSO_4 . Après filtration, les solvants sont évaporés sous pression réduite.

Rendement : 82% ; **Aspect :** huile marron ; **Formule brute :** $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{Ru}$; **Masse molaire :** 317,39 g/mol ; **m/z** 320 : $\text{M}^{++ 104}\text{Ru}$, 318 : $\text{M}^{++ 102}\text{Ru}$, 317 : $\text{M}^{++ 101}\text{Ru}$, 304 : $(\text{M}-\text{NH}_2)^{+104}\text{Ru}$, 302 : $(\text{M}-\text{NH}_2)^{+102}\text{Ru}$, 301 : $(\text{M}-\text{NH}_2)^{+101}\text{Ru}$, 290 : $(\text{M}-\text{CH}_2\text{NH}_2)^{+104}\text{Ru}$, 288 : $(\text{M}-\text{CH}_2\text{NH}_2)^{+102}\text{Ru}$, 287 : $(\text{M}-\text{CH}_2\text{NH}_2)^{+101}\text{Ru}$, 276 : $(\text{M}-\text{NMe}_2)^{+104}\text{Ru}$, 274 : $(\text{M}-\text{NMe}_2)^{+102}\text{Ru}$, 273 : $(\text{M}-\text{NMe}_2)^{+101}\text{Ru}$.

RMN ^1H (CDCl_3) : 4,59 ppm : m, 1H, Cp ; 4,56 ppm : m, 1H, Cp ; 4,48 ppm : s, 5H, Cp' ; 4,41 ppm : m, 1H, Cp ; 3,46 ppm : d ($J = 14,08$ Hz), 1H, CH_2NMe_2 ; 3,40 ppm : d ($J = 12,78$ Hz), 1H, CH_2ND_2 ; 3,28 ppm : d ($J = 14,08$ Hz), 1H, CH_2NMe_2 ; 2,78 ppm : d ($J = 12,78$ Hz), 1H, CH_2ND_2 ; 2,25 ppm : s, 6H, 2CH_3 .

RMN ^{13}C (CDCl_3) : 87,3 ppm : C^{IV} , 82,3 ppm : C^{IV} , 72,9 ppm : CH Cp, 70,7 ppm : CH Cp, 70,6 ppm : CH Cp, 70,5 : CH Cp', 59,0 ppm : CH_2N , 44,7 2CH_3 , 40,8 CH_2NH_2 .

**7-chloro-*N*-{2-[(diméthylamino)méthyl]ruthénocényl}quinoléin-4-amine ou
ruthénoquine**



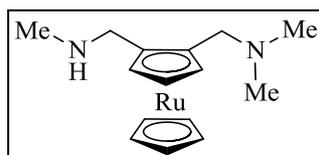
La 1-[2-(aminométhyl)ruthénocényl]-*N,N*-diméthylméthanamine (0,891 g, 2,8 mM) est mélangée avec de la 4,7-dichloroquinoléine (2,784 g, 14,0 mM), de la triéthylamine (2,73g, 27,0 mM), du K_2CO_3 (0,777 g, 5,6 mM) dans la *N*-méthyl-2-pyrrolidone (7,5 mL). Le mélange est chauffé à 135°C sous N_2 durant 6h. Il est ensuite refroidi à température ambiante. La phase organique est extraite avec une solution aqueuse d'acide citrique (5%), puis la phase aqueuse obtenue est neutralisée par K_2CO_3 jusqu'à pH basique en présence de dichlorométhane. La phase organique est lavée par une solution saturée en NaCl. Après séchage de la phase organique sur Na_2SO_4 , les solvants sont évaporés sous pression réduite. Le produit obtenu est purifié sur colonne chromatographique de silice avec comme éluant un mélange d'acétate d'éthyle/éther de pétrole (5:5) puis en suivant un gradient jusqu'à un mélange d'acétate d'éthyle/éther de pétrole/triéthylamine (5:4,5:0,5).

Rendement : 28% ; **Aspect :** solide blanc cassé ; **Formule brute :** $C_{23}H_{24}ClN_3Ru$; **Masse molaire :** 478,98 g/mol ; **F** = 214-215 °C ; **m/z** $MH^+ ^{104}Ru^{35}Cl$, 480 : $MH^+ ^{102}Ru^{35}Cl$, 479 : $MH^+ ^{101}Ru^{35}Cl$, 484 : $MH^+ ^{104}Ru^{37}Cl$, 482 : $MH^+ ^{102}Ru^{37}Cl$, 481 : $MH^+ ^{101}Ru^{37}Cl$, 438 : $(M-NMe_2)^+ ^{104}Ru^{35}Cl$, 436 : $(M-NMe_2)^+ ^{102}Ru^{35}Cl$, 435 : $(M-NMe_2)^+ ^{101}Ru^{35}Cl$, 440 : $(M-NMe_2)^+ ^{104}Ru^{37}Cl$, 438 : $(M-NMe_2)^+ ^{102}Ru^{37}Cl$, 437 : $(M-NMe_2)^+ ^{101}Ru^{37}Cl$. **Analyse élémentaire :** (C, H, N) Calculée : C 57,67 %, H 5,05 %, N 8,77% ; Mesurée : C 56,82 %, H 5,04 %, N 8,77 %.

RMN 1H ($CDCl_3$ + D_2O) : 8,51 ppm : d ($J = 5,38$ Hz), 1H, H2 ; 7,92 ppm : d ($J = 1,92$ Hz), 1H, H8 ; 7,65 ppm : d ($J = 8,94$ Hz), 1H, H5 ; 7,30 ppm : dd ($J = 1,82$ et 8,96 Hz), 1H, H6 ; 6,42 ppm : d ($J = 5,34$ Hz), 1H, H3 ; 4,71 ppm : s, 1H, Cp ; 4,60 ppm : s, 1H, Cp ; 4,55 ppm : s, 5H, Cp' ; 4,44 ppm : t ($J = 2,07$ et 2,02 Hz), 1H, Cp ; 4,15 ppm : d ($J = 13,31$ Hz), 1H, CH_2ND ; 4,05 ppm : d ($J = 13,44$ Hz), 1H, CH_2ND ; 3,58 ppm : d ($J = 12,72$ Hz), 1H, CH_2NMe_2 ; 2,77 ppm : d ($J = 12,78$ Hz), 1H, CH_2NMe_2 ; 2,26 ppm : s, 6H, CH_3 .

RMN ^{13}C (CDCl_3) : 152,11 ppm : CH ; 150,20 ppm : C^{IV} ; 134,65 ppm : C^{IV} ; 128,42 ppm : CH ; 124,82 ppm : CH ; 122,06 ppm : CH ; 117,84 ppm : C^{IV} ; 98,93 ppm : CH ; 87,84 ppm : C^{IV} (Cp) ; 87,70 ppm : C^{IV} (Cp) ; 73,83 ppm : CH (Cp) ; 73,02 ppm : CH (Cp) ; 71,37 ppm : CH (Cp') ; 68,69 ppm : CH (Cp) ; 57,89 ppm : CH_2 ; 44,97 ppm : CH_3 ; 42,04 ppm : CH_2 ; 29,71 ppm : CH_2 .

***N,N*-diméthyl-1-{3-[(méthylamino)méthyl]ruthénocényl}méthanamine**



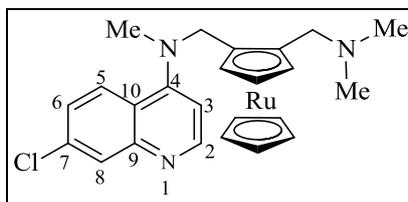
Le 2-((*N,N*-diméthylamino)méthyl)ruthénocènealdéhyde (0,791 g, 2,5 mM) est dissous dans 40 mL de THF anhydre, à cette solution est ajouté du chlorhydrate de méthylamine (0,844 g, 12,5 mM) et du K_2CO_3 (1,035 g, 7,5 mM). La réaction est abandonnée à température ambiante, sous agitation durant 1h30. Le THF est évaporé sous pression réduite et l'huile résultante est dissoute dans du méthanol anhydre. A cette solution est ajoutée du NaBH_4 (0,100g, 2,5 mM) à 0°C , puis le mélange est laissé sous agitation durant 20 min. Il est alors hydrolysé et extrait avec de l'éther diéthylique (2 x 20 mL). Les phases organiques sont rassemblées puis séchées sur MgSO_4 . Après filtration, les solvants sont évaporés sous pression réduite.

Rendement : 94% ; **Aspect :** huile marron ; **Formule brute :** $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{Ru}$; **Masse molaire :** 331,42 g/mol ; **m/z** 335 : $\text{MH}^+{}^{104}\text{Ru}$, 333 : $\text{MH}^+{}^{102}\text{Ru}$, 332 : $\text{MH}^+{}^{101}\text{Ru}$.

RMN ^1H (CDCl_3) : 4,64 ppm : m, 1H, Cp ; 4,56 ppm : m, 1H, Cp ; 4,48 ppm : s, 5H, Cp' ; 4,42 ppm : m, 1H, Cp ; 3,61 ppm : d ($J = 14,2$ Hz), 1H, CH_2 ; 3,46 ppm : d ($J = 12,8$ Hz), 1H, CH_2 ; 3,18 ppm : d ($J = 12,31$ Hz), CH_2 ; 2,75 ppm : d ($J = 12,8$ Hz), 1H, CH_2 ; 2,42 ppm : s, 3H, CH_3 ; 2,19 ppm : s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$.

RMN ^{13}C (CDCl_3) : 89,2 ppm : C^{IV} ; 87,4 ppm : C^{IV} ; 73,4 ppm : CH Cp ; 72,5 ppm : CH Cp ; 71,0 ppm : Cp' ; 68,7 ppm : CH Cp ; 57,8 ppm : CH_2 ; 49,1 ppm : CH_2 ; 44,8 ppm : $\text{N}(\text{CH}_3)_2$; 35,1 ppm : CH_3 .

7-chloro-4-{*N*-méthyl-[2-(*N*',*N*'-diméthylaminométhyl)-*N*-ruthénocénylméthylamino]}-quinoléine ou ruthénoquine méthylée (RQ-Me)

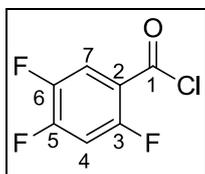


La *N,N*-diméthyl-1-{3-[(méthylamino)méthyl]ruthénocényl}méthanamine (1,00 g, 3,0 mM) est mélangée avec de la 4,7-dichloroquinoléine (2,96 g, 15,0 mM), de la triéthylamine (5,81 g, 57,3 mM), du K_2CO_3 (1,65 g, 11,9 mM) dans de la *N*-méthyl-2-pyrrolidone (21,0 mL). Le mélange est chauffé à 135°C sous N_2 durant 6h. Le mélange est refroidi à température ambiante. La phase organique est extraite avec une solution aqueuse d'acide citrique (5%), puis la phase aqueuse obtenue est neutralisée par K_2CO_3 jusqu'à pH basique en présence de dichlorométhane. La phase organique est lavée par une solution saturée en NaCl. Après séchage de la phase organique sur Na_2SO_4 , les solvants sont évaporés sous pression réduite. Le produit obtenu est purifié sur colonne chromatographique de silice avec comme éluant un mélange d'acétate d'éthyle/éther de pétrole (5:5) puis en suivant un gradient jusqu'à un mélange d'acétate d'éthyle/éther de pétrole/triéthylamine (5:4,5:0,5).

Rendement : 25% ; **Aspect :** solide beige ; **Formule brute :** $C_{24}H_{26}ClN_3Ru$; **Masse molaire :** 493,04 g/mol ; **F** = 146-147 °C ; **m/z** 232 : $MH^+ {}^{104}Ru^{35}Cl$, 230 : $MH^+ {}^{102}Ru^{35}Cl$, 229 : $MH^+ {}^{101}Ru^{35}Cl$, 234 : $MH^+ {}^{104}Ru^{37}Cl$, 232 : $MH^+ {}^{102}Ru^{37}Cl$, 231 : $MH^+ {}^{101}Ru^{37}Cl$.
Analyse élémentaire : (C, H, N) Calculée : C 58,47 %, H 5,32 %, N 8,52 % ; Mesurée : 57,12 %, 5,21 %, 8,17 %.

RMN 1H ($CDCl_3$) : 8,63 ppm : d ($J = 5,1$ Hz), 1H, H2 ; 8,02 ppm : d ($J = 8,8$ Hz), 1H, H5 ; 8,01 ppm : d ($J = 2,5$ Hz), 1H, H8 ; 7,36 ppm : dd ($J = 2,0$ Hz et $J' = 2,2$ Hz), 1H, H6 ; 6,78 ppm : d ($J = 5,2$ Hz), 1H, H3 ; 4,71 ppm : m, 1H, Cp ; 4,64 ppm : m, 1H, Cp ; 4,50 ppm : m, 1H, Cp ; 4,48 ppm : s, 5H, Cp' ; 4,35 ppm : d ($J = 14,7$ Hz), 1H, CH_2 ; 4,22 ppm : d ($J = 14,7$ Hz), 1H, CH_2 ; 3,17 ppm : d ($J = 13,0$ Hz), 1H, CH_2NMe_2 ; 3,02 ppm : s, 3H, NCH_3 ; 2,86 ppm : d ($J = 13,0$ Hz), 1H, CH_2NMe_2 ; 2,10 ppm : s, 6H, CH_3 .

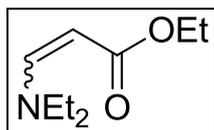
RMN ^{13}C (CDCl_3) : 157,2 ppm : C^{IV} ; 151,4 ppm : CH ; 150,5 ppm : C^{IV} ; 134,6 ppm : C^{IV} ; 128,6 ppm : C^{IV} ; 125,9 ppm : CH ; 125,5 ppm : CH ; 121,6 ppm : CH ; 108,3 ppm : CH ; 87,4 ppm : C^{IV} (Cp) ; 87,3 ppm : C^{IV} (Cp) ; 73,2 ppm : CH (Cp) ; 72,1 ppm : CH (Cp) ; 71,6 ppm : CH (Cp') ; 69,1 ppm : CH (Cp) ; 57,6 ppm : CH_2 ; 54,1 ppm : 2CH_3 ; 45,2 ppm : CH_3 ; 40,2 ppm : CH_2 .

Etude du mécanisme d'action des fluoroquinolones ferrocéniques**chlorure de 2,4,5-trifluorobenzoyl**

Sous atmosphère inerte, l'acide 2,4,5-trifluorobenzoïque (1,504 g, 8,54 mM) et le chlorure d'oxalyle (0,9 mL, 10,4 mM) sont dissous dans 10 mL de dichlorométhane. Le mélange est mis en présence de diméthylformamide (150 μ L, 0,002 mol), durant 24h. Les solvants sont évaporés sous pression réduite. Un liquide incolore est obtenu (1,64 g, 8,45 mM). Le produit a été utilisé sans purification supplémentaire dans l'étape suivante.

Rendement : 99% ; **Aspect :** Liquide incolore ; **Formule brute :** $C_7H_2ClF_3O$; **Masse molaire :** 193,97 g/mol ; **m/z** 159 : $(M-^{35}Cl)^+$, 157 : $(M-^{37}Cl)^+$.

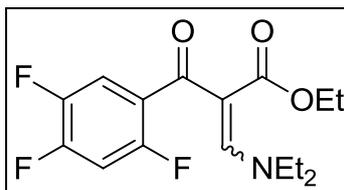
RMN 1H ($CDCl_3$) : 8,01 ppm : m, 1H, CH ; 7,12 ppm : m, 1H, CH.

3-(diéthylamino)acrylate d'éthyle

La diéthylamine (1,4 mL, 13,5 mM) est additionnée au propionate d'éthyle (1,4 mL, 13,7 mM) dans 20 mL d'acétonitrile. Le mélange est abandonné sous agitation durant 24h. Les solvants sont évaporés. Le produit obtenu (2,23 g, 13,4 mM) est utilisé sans purification dans l'étape suivante. Le produit a été utilisé sans purification supplémentaire dans l'étape suivante.

Rendement : 99% ; **Aspect :** huile jaune ; **Formule brute :** $C_9H_{17}NO_2$; **Masse molaire :** 171,13 g/mol.

3-(diéthylamino)-2-(2,4,5-trifluorobenzoyl)acrylate d'éthyle



Le chlorure de 2,4,5-trifluorobenzoyle (0,500 g, 2,58 mM) réagit sur le 3-(diéthylamino)acrylate d'éthyle (0,789 g, 4,61 mM) dans 10 mL de toluène. La triéthyle amine (1,010 g, 10 mM) est ensuite additionnée goutte à goutte. La réaction est portée à 90°C pendant 5h. Elle est arrêtée par ajout d'eau (10 mL), puis le produit est extrait avec de l'acétate d'éthyle (3 x 20 mL). Les solvants des fractions correspondantes au produit sont évaporés sous pression réduite. Un semi solide orange foncé est obtenu (0,620 g, 1,88 mM).

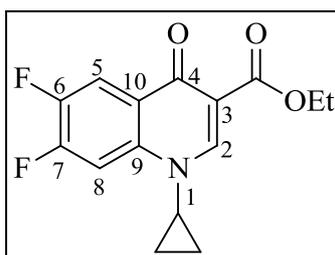
Rendement : 73% ; **Aspect :** semi-solide orange foncé ; **Formule brute :** C₁₆H₁₈F₃NO₃ ; **Masse molaire :** 329,12 g/mol ; **m/z 330 :** MH⁺.

RMN ¹H (CDCl₃) : 7,77 ppm : s, 1H, CH_{arom} ; 7,31 ppm : m, 1H, CH_{arom} ; 6,90 ppm : m, 1H, CH_{arom} ; 4,00 ppm : q (J = 7,11 Hz et J' = 7,14 Hz), 2H, CH₂ (OOEt) ; 3,47 ppm : s large, 2H, N-CH₂ ; 1,28 ppm : s large, 3H, CH₃ ; 1,04 ppm : s large, 3H, CH₃ ; 1,01 ppm : s, 3H, CH₃ (OOEt).

RMN ¹³C (CDCl₃) : 185,1 ppm : CO ; 167,9 ppm : COO ; 154,9 ppm : C^{IV} ; 145,2 ppm : CH_{arom} ; 127,0 ppm : d (J = 15,8 Hz), C^{IV} ; 117,9 ppm : d (J = 19,8 Hz), C^{IV} ; 105,5 ppm : d (J = 20,9 Hz), C^{IV} ; 105,3 ppm : C^{IV} (alcène) ; 102,0 ppm : CH_{arom} ; 60,0 ppm : CH₂ ; 54,4 ppm : CH (alcène) ; 45,5 ppm : NCH₂ ; 14,8 ppm : CH₃ ; 14,1 ppm : CH₃ ; 11,3 ppm : CH₃.

RMN ¹⁹F (CDCl₃) : -115,59 ppm : m, F ; -130,28 ppm : s large, F ; -142,81 ppm : m, F.

1-cyclopropyl-6,7-difluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoléine-3-carboxylate d'éthyle



Le 3-(diéthylamino)-2-(2,4,5-trifluorobenzoyl)acrylate d'éthyle (2,1g, 6,38 mM) réagit sur la cyclopropanamine (0,8 mL, 11,54 mM) dans 40 mL d'une solution éthanol/eau (1:2), sous agitation, à reflux durant 3 heures. Après refroidissement, le milieu réactionnel est solubilisé dans 30 mL de DMF avec K_2CO_3 (3,1g, 22,5 mM). Le mélange est porté à 100°C, sous agitation, durant 7 heures. Après refroidissement, 5 mL d'eau sont ajoutés, puis le mélange réactionnel est filtré ce qui permet l'obtention du 1-cyclopropyl-6,7-difluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoléine-3-carboxylate d'éthyle. Le produit est purifié sur colonne chromatographique de silice avec comme éluant un mélange dichlorométhane/méthanol (96:4). Les solvants des fractions correspondantes au produit sont évaporés sous pression réduite. Un solide jaune est obtenu (1,5 g, 5,04 mM).

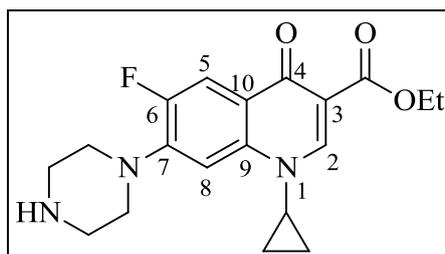
Rendement : 79% ; **Aspect :** solide jaune ; **Formule brute :** $C_{15}H_{13}F_2NO_3$; **Masse molaire :** 293,09 g/mol ; **F** = 224-226 °C ; **m/z** 293,9 : MH^+ .

RMN 1H ($CDCl_3$) : 8,57 ppm : s, 1H, H2 ; 7,35 ppm : m, 1H, CH_{arom} ; 6,80 ppm : m, 1H, CH_{arom} ; 4,40 ppm : q ($J=7,14$ Hz, et $J'=7,11$ Hz), 2H, CH_2 ; 3,44 ppm : s, 1H, CH ; 1,35 ppm : s, 5H, $CH_3 + CH_2$; 1,17 ppm : s, 2H, CH_2 (Cp).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : 172,7 ppm : C4 ; 165,3 ppm : COO ; 156,4 ppm : C6 ; 148,9 ppm : C7 ; 137,5 ppm : d ($J = 10,1$ Hz), C9 ; 125,7 ppm : d ($J = 6, 2$ Hz), C10 ; 115,3 ppm : d ($J = 18,3$ Hz), C8 ; 110,9 ppm : C3 ; 105,5 ppm : d ($J = 22,5$ Hz), C5 ; 61,1 ppm : CH_2 ; 34,8 ppm : CH (cyclopropyle) ; 14,4 ppm : CH_3 ; 8,2 ppm : CH_2 (cyclopropyle).

RMN ^{19}F ($CDCl_3$) : -138,82 ppm : m, F ; -127,33 ppm : m, F.

1-cyclopropyl-6-fluoro-4-oxo-7-(pipérazin-1-yl)-1,4-dihydroquinoléine-3-carboxylate d'éthyle



Sous N_2 , le 1-cyclopropyl-6,7-difluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoléine-3-carboxylate d'éthyle (0,071 g, 0,24 mM) et la pipérazine (0,142 g, 1,65 mM) sont chauffés à reflux dans 4 mL d'acétonitrile pendant 48h. Après hydrolyse (20 mL d'eau) et extraction (3 x 20 mL de dichlorométhane), la phase organique est séchée sur Na_2SO_4 puis évaporée sous pression réduite. Le produit est alors purifié sur colonne de silice avec comme éluant: $CH_2Cl_2/MeOH$ (99,5:0,5). Les solvants des fractions correspondantes au produit sont évaporés sous pression réduite. Un solide ocre est obtenu (0,079 g, 0,22 mM).

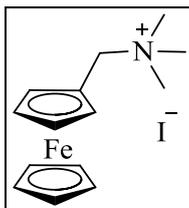
Rendement : 92% ; **Aspect :** solide ocre ; **Formule brute :** $C_{19}H_{22}FN_3O_3$; **Masse molaire :** 359,16 g/mol ; **F** = 250-252 °C ; **m/z** 360 : MH^+ . **Analyse élémentaire :** (C, H, N) Calculée : C 63,50 %, H 6,17 %, N 11,69 ; Mesurée : C 63,45 %, H 6,25 %, N 11,61 %.

RMN 1H ($CDCl_3$) : 8,49 ppm : s, 1H, H2 ; 7,98 ppm : d ($J = 13,39$ Hz), 1H, H5 ; 7,28 ppm : d ($J = 7,15$ Hz), 1H, H8 ; 4,37 ppm : m, 2H, CH_2 ; 3,44 ppm : m, 1H, CH (cyclopropyle) ; 3,22 ppm : m, 4H, $2CH_2$; 3,10 ppm : m, 4H, $2CH_2$; 1,40 ppm : t ($J = 7,1$ Hz), 3H, CH_3 ; 1,32 ppm : qua ($J = 7,62$ et $6,36$ Hz), 2H, CH_2 (cyclopropyle) ; 1,14 ppm : qua ($J = 1,92$ et $2,04$ Hz), 2H, CH_2 (cyclopropyle).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : 173,1 ppm : C^{IV} , C4 ; 165,8 ppm : C^{IV} , COO ; 153,4 ppm : d ($J = 250$ Hz), C6 ; 148,1 ppm : C2 ; 145,0 ppm : d ($J = 9$ Hz), C7 ; 137,9 ppm : C^{IV} , C9 ; 122,8 ppm : d ($J = 7$ Hz), C^{IV} , C10 ; 112,9 ppm : d ($J = 22$ Hz), C5 ; 110,3 ppm : C^{IV} , C3 ; 104,7 ppm : d ($J = 3$ Hz), C8 ; 60,9 ppm : CH_2 ; 53,45 ppm, 51,20 ppm et 45,99 ppm : CH_2N ; 34,49 ppm : CH (cyclopropyle) ; 14,45 ppm : CH_3 ; 8,13 ppm : CH_2 (cyclopropyle).

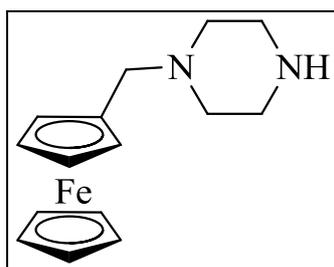
RMN ^{19}F ($CDCl_3$) : 123,5 ppm : dd ($J = 7,0$ Hz et $J' = 12,9$ Hz), F.

Iodure de ferrocénylméthylène-*N,N,N*-triméthylammonium



Le (*N,N*-diméthylamminométhyl)ferrocène (0,635 g, 2,61 mM) est mis en présence d'iodure de méthyle (1,37 g, 9,64 mM) dans 4 mL d'acétone, sous agitation à température ambiante et pendant 1h. Un solide marron est obtenu (1,11g, 0,003 mol). Le produit est immédiatement inclus dans la réaction suivante.

Ferrocénylméthylpipérazine



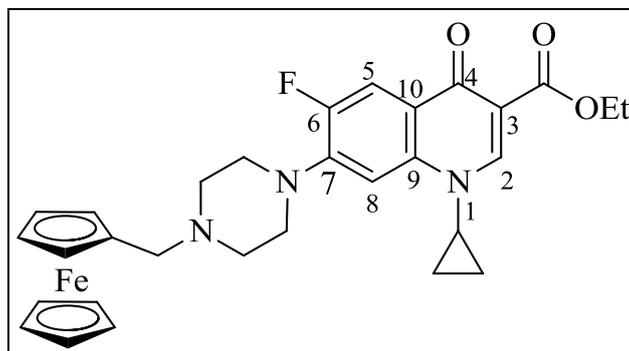
L'iodure de ferrocénylméthylène-*N,N,N*-triméthylammonium est additionné de la pipérazine (1,40 g, 16,28 mM) en présence de K_2CO_3 (1,33 g, 9,63 mM) dans 14 mL d'acétonitrile. Le mélange est porté à reflux durant 24h. Le produit est ensuite purifié sur colonne chromatographique de silice en prenant comme éluant un mélange dichlorométhane/méthanol (100:0 puis avec un gradient jusqu'à 91:8:1 de dichlorométhane/méthanol/triéthylamine). Les solvants des fractions correspondantes au produit sont évaporés sous pression réduite. Un solide jaune est obtenu (0,719 g, 2,53 mM).

Rendement : 97% ; **Aspect :** solide jaune ; **Formule brute :** $C_{15}H_{20}FeN_2$; **Masse molaire :** 284,10 g/mol ; **F** = 97-98 °C ; **m/z** 285 : MH^+ .

RMN 1H ($CDCl_3$) : 4,12 ppm : s, 2H, Cp ; 4,07 ppm : s, 2H Cp + Cp' ; 3,31 ppm : m, 2H, CH_2 -Fc, 2,80 ppm : m, 4H, $2xCH_2N$; 2,34 ppm : m, 2H, CH_2N .

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : 82,23 ppm : Cp, 68,61 ppm : Fc, 58,85 ppm : $FcCH_2N$, 53,57 ppm : CH_2N (pipérazine), 45,64 ppm : CH_2 (pipérazine).

7-(-4-ferrocéneméthylpipérazine-1-yl)-1-cyclopropyl-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoléine-3-carboxylate d'éthyle



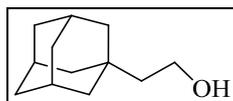
Le 1-cyclopropyl-6,7-difluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoléine-3-carboxylate d'éthyle (0,078 g, 0,27 mM) et la ferrocénylméthylpipérazine (82 mg, 0,29 mM) sont chauffées à reflux dans 3 mL d'acétonitrile et en présence de triéthylamine (110 μ L, 0,79 mM) durant sept jours. Le produit est ensuite purifié sur colonne de silice, avec comme éluant un mélange de dichlorométhane/méthanol (100:0 puis suivant un gradient jusque 95:5). Les solvants des fractions correspondantes au produit sont évaporés sous pression réduite. Un solide jaune orangé est obtenu (0,072 g, 0,13 mM).

Rendement : 48% ; **Aspect :** solide jaune-orangé ; **Formule brute :** $C_{30}H_{32}N_3O_3FFe$; **Masse molaire :** 557,18 g/mol ; **F** = 210-211 $^{\circ}C$; **m/z** 558 : MH^+ . **Analyse élémentaire :** (C, H, N) Calculée : C 64,64 %, H 5,74 %, N 7,54 % ; Mesurée : C 64,66 %, H 5,71 %, N 7,55 %.

RMN 1H ($CDCl_3$) : 8,5 ppm : s, 1H, H2 ; 8,0 ppm : d ($J=14,4$ Hz), 1H, H5 ; 7,22 ppm : d ($J=7,56$ Hz), 1H, H8 ; 4,29 ppm : q ($J=7,11$ Hz), 2H, O- CH_2-CH_3 ; 4,15 ppm : m, 9H, Fc ; 3,48 ppm : s, 2H, CH_2-Fc ; 3,39 ppm : t ($J=7,48$ Hz et $J'=3,74$ Hz), 1H, CH(cPr) ; 3,24 ppm : m, 2H, CH_2-N ; 2,65 ppm : m, 2H, CH_2-N ; 1,40 ppm : t ($J=7,11$ Hz), 3H, CH_3 ; 1,27 ppm : m, 2H, $CH_2(cPr)$; 1,10 ppm : m, 2H, $CH_2(cyclopropyle)$.

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : 173,1 ppm : C^{IV} , C4 ; 165,66 ppm : COO ; 153,248 ppm : d ($J=248,0$ Hz), C6 ; 148,172 ppm : C2 ; 143,973 ppm : d (10,5 Hz), C7 ; 137,948 ppm : d (1,2 Hz), C10 ; 123,18 ppm : d (7,0 Hz), C9 ; 113,15 ppm : d ($J = 23$ Hz) ; 110,3 ppm : C3 ; 105,0 ppm : C8 ; 77,9 ppm : C9 ; 69,5 ppm : Fc ; 60,8 ppm : CH_2Et ; 57,2 ppm : CH_2-Fc ; 51,0 ppm : CH_2N ; 48,5 ppm : CH_2N ; 34,5 ppm : CH(cPr) ; 14,4 ppm : CH_3 ; 8,1 : $CH_2(cPr)$.

RMN ^{19}F ($CDCl_3$) : -123,56 ppm : dd ($J=13,37$ Hz et $J'=7,16$ Hz), F.

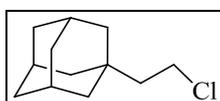
2-adamanta-1-yléthanol

Sous N_2 , une solution d'acide 2-adamant-1-ylacétique (0,500 g, 0,0026 mol) dans 10 mL de THF anhydre est ajoutée goutte à goutte à une suspension de $LiAlH_4$ (0,200 g, 0,0053 mol) dans 10 mL de THF anhydre. Le mélange est agité durant 12h à température ambiante. Après ce temps, le mélange est hydrolysé par addition lente d'éthanol, puis de glace. Le mélange est ensuite acidifié par une solution aqueuse d'acide citrique à 5% (10mL). Le mélange est ensuite extrait par de l'éther diéthylique (3×10 mL). La phase organique est ensuite lavée deux fois par une solution aqueuse de $NaHCO_3$ à 5% (5mL) puis par de l'eau distillée (10 mL). La phase organique est ensuite séchée sur $MgSO_4$ anhydre. Après filtration, les solvants sont évaporés sous pression réduite.

Rendement : 98% ; **Aspect :** solide blanc ; **Formule brute :** $C_{12}H_{20}O$; **Masse molaire :** 180,15 g/mol ; **F** = 84-86 °C ; **m/z** 181 [MH⁺]

RMN 1H ($CDCl_3$) : 3,71 ppm ; t (J=7,23 Hz), 2H, $-CH_2-CH_2-OH$; 1,94 ppm ,m, 3H, $3CH\beta-Ad$); 1,65 ppm : m, 12H, $3CH_2\alpha-Ad$ and $3CH_2\gamma-Ad$); 1,38 ppm : t (J = 7,23 Hz), 2H, , $-CH_2-CH_2-OH$.

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : 59,2 ppm : $-CH_2-CH_2-OH$; 47,5 ppm : $-CH_2-CH_2-OH$; 43,1 ppm : $3CH_2\alpha-Ad$; 37,4 ppm : $3CH_2\gamma-Ad$; 28,9 ppm : $3CH\beta-Ad$.

Chlorure de 2-adamant-1-yléthyle

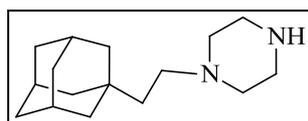
Le 2-adamant-1-yléthanol (0,690 g, 3,8 mmol) est dissous dans 0,15 mL de pyridine et 1 mL de chlorure de thionyle. Le mélange est chauffé à 70°C durant 2h. Le mélange est ensuite refroidi à température ambiante avant d'être hydrolysé par de l'eau distillée (10 mL). La phase aqueuse est extraite par du dichlorométhane (3×10 mL). La phase organique est séchée sur $MgSO_4$ anhydre. Après filtration, les solvants sont évaporés sous pression réduite. Un solide beige (0,530g, 2,7 mmol) est obtenu (70 %).

Rendement : 70% ; **Aspect :** Solide beige ; **Formule brute :** C₁₂H₁₉Cl ; **Masse molaire :** 198,12 g/mol ; **F** = 230-232 °C ; **m/z** 199 [MH⁺].

RMN ¹H (CDCl₃) : 3,52 ppm : t (J=8,04 Hz) , 2H, CH₂-CH₂-Cl; 1,93 ppm : s, 2H, -CH₂-CH₂-Cl; 1,61 ppm : m, 9H, 3CH_β-Ad et 3CH_{2α}-Ad; 1,49 ppm : m, 3CH_{2γ}-Ad.

RMN ¹³C (CDCl₃) : 40,9 ppm : -CH₂-CH₂-Cl; 42,3 ppm : -CH₂-CH₂-Cl; 43,6 ppm : 3CH_{2α}-Ad; 37,5 ppm : 3CH_{2γ}-Ad; 29,1 ppm : 3CH_β-Ad; 20,8 ppm : C^{IV}-Ad.

1-[2-(adamantan-1-yl)éthyl]pipérazine



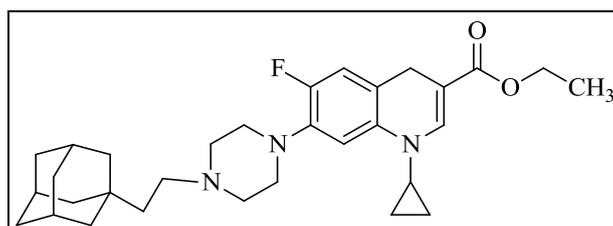
Le chlorure de 2-adamant-1-ylacétyle (0,400 g, 2 mmol), la pipérazine (1.220 g, 14 mmol) et K₂CO₃ (1,180 g, 8,6 mmol) sont dissous dans 10 mL d'acétonitrile. Le mélange est porté à reflux durant 24h. Après ce temps, le mélange est refroidie à température ambiante puis il est hydrolysé avec de l'eau distillée (20 mL). Le mélange est ensuite extrait par du dichlorométhane (3×20 mL). La phase organique est séchée sur MgSO₄ anhydre. Après filtration, les solvants sont évaporés sous pression réduite. Un solide beige (0,430 g, 1,7 mmol) est obtenu (87%).

Rendement : 87% ; **Aspect :** solide beige ; **Formule brute :** C₁₆H₂₈N₂; **Masse molaire :** 248,23 g/mol ; **F** = 102-104°C ; **m/z** 249 [MH⁺].

RMN ¹H (CDCl₃) : 2,83 ppm : t (J=8,81 Hz), 4H, 2CH₂ (pipérazine) ; 2,37 ppm : m, H, -CH₂-CH₂-pipérazine; 2,25 ppm : t (J=9,12 Hz), 4H, 2CH₂ (pipérazine) ; 1,86 ppm : m, 3H, 3CH-Ad; 1,59 ppm : m, 6H, 3CH₂-αAd; 1,42 ppm : m, 6H, 3CH₂-γAd; 1,20 ppm : m, 2H, -CH₂-CH₂-pipérazine.

RMN ^{13}C (CDCl_3) : 54,6 ppm : $-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ -pipérazine ; 52,8 ppm : CH_2 de la pipérazine ; 46,0 ppm : CH_2 de la pipérazine ; 42,2 ppm : $3\text{CH}_2-\gamma\text{Ad}$; 40,7 ppm : $-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ -pipérazine ; 37,2 ppm : $3\text{CH}_2-\alpha\text{Ad}$; 28,5 ppm : $3\text{CH}-\text{Ad}$; 21,7 ppm : $\text{C}^{\text{IV}}\text{Ad}$.

7-(4-{2-[(adamantan-1-yl)éthyl]pipérazin-1-yl})-1-cyclopropyl-6- fluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoléine-3-carboxylate d'éthyle



Le 1-[2-(adamantan-1-yl)éthyl]pipérazine (0,186 g, 0,75 mmol) et le 1-cyclopropyl-6,7-difluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoléine-3-carboxylate d'éthyle (0,110 g, 0,37 mmol) sont dissous dans 6 mL d'acétonitrile. Le mélange est porté à reflux durant sept jours. Après ce temps, le mélange est refroidie à température ambiante puis il est hydrolysé par de l'eau distillée (20 mL). Le mélange est ensuite extrait par du dichlorométhane (3×20 mL). La phase organique est séchée sur du MgSO_4 anhydre. Après filtration, les solvants sont évaporés sous pression réduite. Le résidu est purifié sur colonne chromatographique de silice, avec comme éluant un mélange d'acétate d'éthyle/éther de pétrole (7:3) avec un gradient jusqu'à acétate d'éthyle/éther de pétrole/méthanol (9:0.5:0.5). Un solide beige (0,117 g, 0,22 mmol) est obtenu (30 %).

Rendement : 30% ; **Aspect :** solide beige ; **Formule brute :** $\text{C}_{31}\text{H}_{42}\text{FN}_3\text{O}_2$; **Masse molaire :** 507,33 g/mol ; **F** = 110-112 °C ; **m/z** 522 [MH⁺]. **Analyse élémentaire :** (C, H, N) Calculée : C 73,34 %, H 8,34 %, N 8,28 % ; Mesurée : C 73,36 %, H 8,25 %, N 8,35 %.

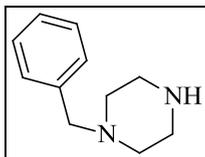
RMN ^1H (CDCl_3) : 8,44 ppm : s, 1H, H2 ; 7,95 ppm : d (J=13,62 Hz), 1H, H5 ; 7,20 ppm : s, 1H, H8 ; 4,31 ppm : q (J=7,08 Hz), 2H, $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{O}$; 3,36 ppm : quin (J = 3,27 Hz), 1H, CH (cyclopropyle) ; 3,22 ppm : t (J=4,05 Hz), 4H, 2CH_2 (pipérazine) ; 2,60 ppm : t (J=4,29 Hz), 4H, 2CH_2 de pipérazine) ; 2,37 ppm : t (J=7,83 Hz), 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ -pipérazine ; 1,89 ppm : m, 3H, $3\text{CH}-\text{Ad}$; 1,64 ppm : m, 6H, $3\text{CH}_2\gamma\text{-Ad}$; 1,46 ppm : m, 6H, $3\text{CH}_2\alpha\text{-Ad}$; 1,33 ppm : t

($J=7,08$ Hz), 3H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O}$; 1,24 ppm : m, 4H, CH_2 (cyclopropyle) et $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-pipérazine}$; 1,06 ppm : m, 2H, CH_2 (cyclopropyle).

RMN ^{13}C (CDCl_3) : 173,1 ppm : -C=O ; 166,0 ppm : -COO ; 153,2 ppm : C6; 148,2 ppm : C2 ; 144,6 ppm : C7 ; 138,0 ppm : C10 ; 122,7 ppm : C9 ; 113,3 ppm : C5; 110,4 ppm : C3 ; 104,7 ppm : C8 ; 60,9 ppm : $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O}$; 53,2 ppm : 2CH_2 de pipérazine ; 52,8 ppm : $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-piperazine}$; 50,0 ppm : 2CH_2 de pipérazine ; 42,6 ppm : $3\text{CH}_2\alpha\text{-Ad}$; 41,0 ppm : $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-piperazine}$; 37,1 ppm : $3\text{CH}_2\gamma\text{-Ad}$; 34,5 ppm : CH (cyclopropyle) ; 31,8 ppm : CIV-Ad; 28,6 ppm : 3CH-Ad ; 14,4 ppm : $\text{-CH}_3\text{-CH}_2\text{-O}$; 8,1 ppm : CH_2 (cyclopropyle).

RMN ^{19}F (CDCl_3) : -123,5 ppm : F.

Benzylpipérazine



Le chlorure de benzyle (1,32 g, 0,01 mol), la pipérazine (2,65 g, 0,03 mol) et le K_2CO_3 (2,60 g, 0,02 mol) sont dissous dans 40 mL d'acétonitrile. Le mélange est porté à reflux durant 24h. Après ce temps, le mélange est refroidie à température ambiante puis il est hydrolysé par de l'eau distillée (20 mL). Le mélange est ensuite extrait par de l'acétate d'éthyle (3 x 20 mL). La phase organique est séchée sur Na_2SO_4 . Après filtration, les solvants sont évaporés sous pression réduite. Un solide blanc (1,76 g, 0,01 mol) est obtenu (99%).

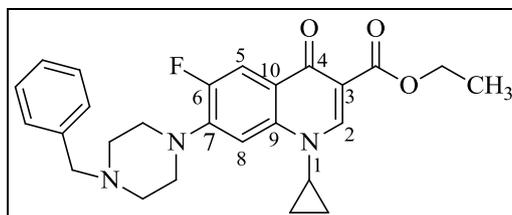
Rendement : 99% ; **Aspect :** solide blanc; **Formule brute :** $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{N}_2$; **Masse molaire :** 176,13 g/mol ; **F** = 253-255 °C ; **m/z** 177 [MH+]

RMN ^1H (CDCl_3) : 7,18-7,31 ppm : m, 5H, 5CH_{arom} , 3,46 ppm : s, 2H, CH_2 , 2,84 ppm : t, 4H, $J = 4,95$ Hz, 2CH_2 pipérazine, 2,37 ppm : m, 4H, 2CH_2 pipérazine.

RMN ^{13}C (CDCl_3) : 137,8 ppm : $\text{C}^{\text{IV}}_{\text{arom}}$, 128,8 ppm : 2CH_{arom} , 127,8 ppm : 2CH_{arom} , 126,6 ppm : CH_{arom} , 63, 3 ppm : CH_2 , 54.1 ppm : 2CH_2 pipérazine, 45.7 ppm : 2CH_2 pipérazine.

7-(4-Benzyl-pipérazin-1-yl)-1-cyclopropyl-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoléine-

3-carboxylate d'éthyle



Sous N₂, une solution de 1-cyclopropyl-6,7-difluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoléine-3-carboxylate d'éthyle (0,071 g, 0,24 mmol), la 1-benzylpipérazine (0,142 g, 0,81 mmol) et la triéthylamine (110 μL, 0,75 mmol) sont portés à reflux dans 4 mL d'acétonitrile, durant sept jours. Après refroidissement à température ambiante, le mélange est hydrolysé par de l'eau distillée (20 mL), puis il est extrait par du dichlorométhane (3×20 mL). La phase organique est séchée sur MgSO₄ anhydre. Après filtration, les solvants sont évaporés sous pression réduite. Le résidu est ensuite purifié sur colonne chromatographique de silice, avec comme éluant un mélange dichlorométhane/méthanol (avec un gradient allant de 99,5:0,5 à 95:5). Un solide marron-orangé (0,067 g, 0,15 mmol) est obtenu (64%).

Rendement : 64% ; **Aspect :** solide marron-orangé ; **Formule brute :** C₂₆H₃₀FN₃O₂ ; **Masse molaire :** 435,23 g/mol ; **F** = 120-122 °C ; **m/z** 450 [MH⁺]. **Analyse élémentaire :** (C, H, N) Calculée : C 71,69 %, H 6,89 %, N 9,65 % ; Mesurée : C 71,71 %, H 6,90 %, N 9,61 %.

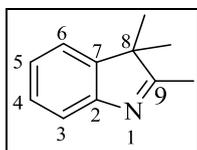
RMN ¹H (CDCl₃) : 8,42 ppm : s, 1H, H2 ; 7,88 ppm : d (J = 13,8 Hz), 1H H5 ; 7,30 ppm : m, 5H, CH_{arom} ; 7,21 ppm : d (J = 8,1 Hz), 1H, H8 ; 4,34 ppm : q (J = 7,0 Hz), 2H, CH₂ ; 3,59 ppm : s, 2H, CH₂-benzyle ; 3,41 ppm : t (J = 7,2 et 3,6 Hz), 1H, CH (cyclopropyle) ; 3,26 ppm : m, 4H, 2xCH₂ (pipérazine) ; 2,66 ppm : m, 4H, 2xCH₂ (pipérazine) ; 1,37 ppm : t (J = 7,2 Hz), 3H, CH₃ ; 1,27 ppm : m, 2H, CH₂ (cyclopropyle) ; 1,10 ppm : m, 2H, CH₂ (cyclopropyle).

RMN ¹³C (CDCl₃) : 173,0 ppm : d (J = 2,3 Hz), C4 ; 165,8 ppm : COO, 153,8 ppm : d (J = 249 Hz) : C6, 148,0 ppm : C7 ; 144,5 ppm : d (J = 11 Hz), C2 ; 137,9 ppm : d (J = 1 Hz), C^{IV}, 137,8 ppm : C9 ; 129,2 ppm : 2xCH_{arom} ; 128,3 ppm : 2xCH_{arom} ; 127,2 ppm : CH_{arom} ; 122,7 ppm : d (J = 7 Hz), C10 ; 112,9 ppm : d (J = 23 Hz), C5 ; 110,0 ppm : C3 ; 104,8 ppm : d (J = 3 Hz), C8 ; 63 ppm : CH₂-benzyle ; 52,8 ppm : CH₂ ; 50,0 ppm : 2xCH₂ (pipérazine) ; 48,5

ppm : 2xCH₂ (pipérazine) ; 34,5 ppm : CH (cyclopropyle) ; 14,5 ppm : CH₃ ; 8,1 ppm : 2CH₂ (cyclopropyle).

RMN ¹⁹F (CDCl₃) : -123,5 ppm : dd (J = 13,4 et 7,3 Hz).

Traceurs

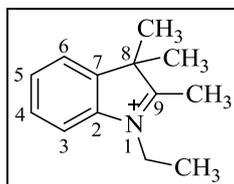
2,3,3-triméthyl-3H-indole

La 2-méthylbutan-2-one (8 mL, 0,075 mol) et la phénylhydrazine (1,8 mL, 0,018 mol) sont dissolues dans 3 mL d'acide acétique glaciale. Le mélange est chauffé à 125°C durant 1 nuit. Après ce temps, le mélange est refroidi à température ambiante puis il est hydrolysé avec 5 mL d'eau distillée. La phase aqueuse est extraite par de l'éther diéthylique (3 x 5 mL). La phase organique est lavée trois fois par de l'eau distillée, puis elle est séchée sur Na₂SO₄. Après filtration, les solvants sont évaporés sous pression réduite. Une huile marron est obtenue (m = 2,55 g, 0,016 mol)

Rendement : 90 % ; **Aspect :** huile marron ; **Formule brute :** C₁₁H₁₃N ; **Masse molaire :** 159,10 g/mol ; **m/z** 160 [MH⁺].

RMN ¹H (CDCl₃) : 7.53 ppm : d (J = 7.6 Hz), 1H, CH_{arom} ; 7.26-7.31 ppm : m, 2H, 2CH_{arom} ; 7.17-7.21 ppm : m, 1H, CH_{arom} ; 2.27 ppm : s, 3H, CH₃ ; 1.29 ppm : s, 6H, 2CH₃.

RMN ¹³C (CDCl₃) : 170,8 ppm : C^{IV}, C9 ; 151,7 ppm : C^{IV}, C8 ; 150,8 ppm : C^{IV}, C2 ; 129,3 ppm : CH, C4 ; 127,4 ppm : CH, C5 ; 123,1 ppm : C^{IV}, C6 ; 120,4 ppm : C^{IV}, C3 ; 44,7 ppm : C^{IV}, C8 ; 25,2 ppm : 2CH₃ ; 15,8 ppm : CH₃.

Iodure de N-éthyl-2, 3, 3-triméthyl-3H-indolium

Le 2,3,3-triméthyl-3H-indole (0,5 g, 0.003 mol) et l'iodure d'éthyle (1 mL, 0.012 mol) sont mis dans 2 mL d'acétonitrile. Le mélange est porté à reflux durant 20h à 80°C. Après ce temps, le mélange est refroidie à température ambiante puis il est mis en présence de 20 mL

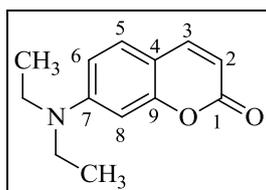
d'éther diéthylique. Le précipité formé est filtré sur verre fritté puis il est séché sous vide. Un solide rouge est obtenu (0,54 g, 0.003 mol).

Rendement : 95 % ; **Aspect :** solide rouge ; **Formule brute :** $C_{12}H_{16}N^+$; **Masse molaire :** 188,14 g/mol ; **F** = 165-167 °C ; **m/z** 189 [MH+].

RMN 1H ($CDCl_3$) : 7,74 ppm : m, 1H, CH_{arom} ; 7,60 ppm : t ($J = 1,7$ Hz), 3H, $3CH_{arom}$; 4,76 ppm : qua ($J = 7,1$ Hz), 2H, CH_2 ; 3,16 ppm : s, 3H, CH_3 ; 1,66 ppm : s, 6H, $2CH_3$.

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : 195,8 ppm : C^{IV} , C9 ; 141,7 ppm : C^{IV} , C8 ; 140,8 ppm : C^{IV} , C2 ; 130,2 ppm : CH, C4 ; 129,6 ppm : CH, C5 ; 123,5 ppm : C^{IV} , C6 ; 115,4 ppm : C^{IV} , C3 ; 54,7 ppm : C^{IV} , C8 ; 45,5 ppm : CH_2 (Et), 23,1 ppm : $2CH_3$; 16,5 ppm : CH_3 (Et) ; 13,7 ppm : CH_3 .

7-diéthylaminocoumarine



Le 4-diéthylaminosalicylaldéhyde (1,93 g, 0,010 mol), le diéthylmalonate (3,20g, 0,020 mol) et la pyridine (1mL, 0,012 mol) sont dissous dans 30 mL d'éthanol absolu. Le mélange est chauffé à reflux durant 6h. Après ce temps, le mélange est refroidie à température ambiante puis l'éthanol est évaporé sous pression réduite. Le résidu est mis en présence de 20 mL d'acide chlorhydrique concentré (37%) et de 20 mL d'acide acétique glacial. Le mélange est chauffé à reflux durant 6h. Après ce temps, le mélange est refroidi à température ambiante puis il est hydrolysé par 100 mL d'eau distillée. Une solution aqueuse de soude (40%) est ajoutée goutte à goutte jusqu'à pH = 5. Le mélange est agité durant 30 min puis le précipité est filtré sur verre fritté puis lavé à l'eau distillée. Le solide est ensuite séché sous vide puis il est recristallisé dans 25 mL de toluène. Un solide orange brillant est obtenu (1,70 g, 0,008 mol)

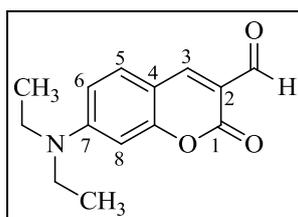
Rendement : 78 % ; **Aspect :** solide orange brillant ; **Formule brute :** $C_{13}H_{15}NO_2$; **Masse molaire :** 217,11 g/mol ; **F** = 114-116 °C ; **m/z** 218 [MH+].

RMN 1H ($CDCl_3$) : 7,54 ppm : d ($J = 9,2$ Hz), 1H, H3 ; 7,25 ppm : sd, ($J = 2,6$ Hz), 1H, H5 : 6,56 ppm : dd ($J = 2,5$ Hz et $J' = 6,2$ Hz), 1H, H6, 6,49 ppm : sd ($J = 2,3$ Hz), 1H, H8, 6,03

ppm : d ($J = 9,5$ Hz), 1H, H2, 3,41 ppm : qua ($J = 7,4$ Hz et $J' = 5,0$ Hz), 4H, 2CH₂, 1,21 ppm : t ($J = 7$ Hz), 6H, 2CH₃.

RMN ¹³C (CDCl₃) : 161,2 ppm : C^{IV}, C1 ; 156,3 ppm : CH, C8 ; 148,5 ppm : C^{IV}, C7 ; 144,2 ppm : CH, C3 ; 130,1 ppm : CH, C5 ; 115,4 ppm : CH, C2 ; 110,2 ppm : C^{IV}, C4 ; 108,7 ppm : CH, C6 ; 99,8 ppm : CH, C8 ; 48,3 ppm : 2CH₂ ; 12,8 ppm : 2CH₃.

7-diéthylaminocoumarin-3-al



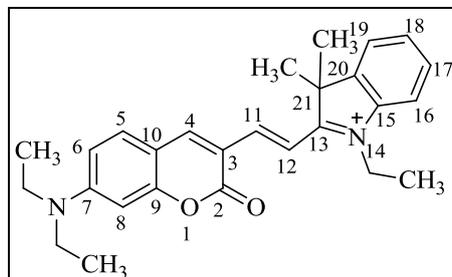
Sous N₂, le trichlorure de phosphore (1,4 mL, 0,015 mol) et la DMF anhydre (8,4 mL, 0,108 mol) sont chauffés à 35°C durant 30 min. Après ce temps, une solution de 7-diéthylaminocoumarine (1g, 0,005 mol) dans 7mL de DMF anhydre est ajoutée goutte à goutte. Le mélange est porté à 60°C durant une nuit. Après ce temps, le mélange est refroidi à température ambiante puis il est hydrolysé par de l'eau distillée glacée (100 mL). Le pH de la solution résultante, est ajusté à 7 grâce à une solution aqueuse de soude (20%). Le précipité formé est filtré sur verre fritté puis il est lavé à l'eau distillée. Le solide est séché sous vide. Un solide beige est obtenu (0,84 g, 0,003 mol).

Rendement : 69 % ; **Aspect** : solide beige ; **Formule brute** : C₁₄H₁₅NO₃ ; **Masse molaire** : 245,11 g/mol ; **F** = 117-118 °C ; **m/z** 246 [MH⁺].

RMN ¹H (CDCl₃) : 10,13 ppm : s, 1H, CHO ; 8,26 ppm : s, 1H, H3 ; 7,42 ppm : d, $J = 8,7$ Hz, 1H, H5 ; 6,64 ppm : dd ($J = 2,5$ Hz et $J' = 6,7$ Hz), 1H, H6 ; 6,49 ppm : sd ($J = 2,3$ Hz), 1H, H8 ; 3,48 ppm : qua ($J = 7,2$ Hz et $J' = 6,9$ Hz), 4H, 2CH₂ ; 1,26 ppm : t ($J = 7,2$ Hz), 6H, 2CH₃.

RMN ¹³C (CDCl₃) : 188,0 ppm : CHO ; 160,2 ppm : C1 ; 145,4 ppm : C7 ; 140,1 ppm : C3 ; 132,6 ppm : C2 ; 130,3 ppm : C5 ; 110,5 ppm : C6 ; 110,2 ppm : C4 ; 97,2 ppm : C8 ; 45,3 ppm : 2CH₂ ; 12,5 ppm : 2CH₃.

L'iodure de 2-(2-(7-(diéthylamino)-2-oxo-2H-chromèn-3-yl)vinyl)-1-éthyl-3,3-diméthyl-3H-indol-1-ium



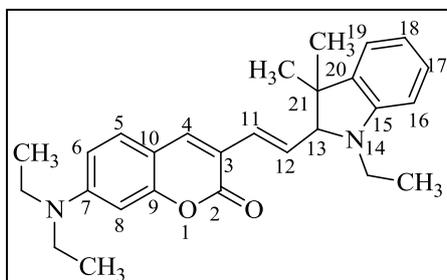
L'iodure de N-éthyl-2, 3, 3-triméthyl-3H-indolinium (0,126 g, 0,7 mmol) et le 7-diéthylaminocoumarin-3-al (0,100 g, 0,4 mmol) sont dissous dans 20mL d'éthanol anhydre. Le mélange est chauffé à reflux durant 48h. Après ce temps, le mélange est refroidie à température ambiante puis les solvants sont évaporés sous pression réduite. Un solide bleu-vert est obtenu (0,126 g, 0,3 mmol)

Rendement : 76 % ; **Aspect :** solide bleu-vert ; **Formule brute :** $C_{27}H_{31}N_2O_2^+$; **Masse molaire :** 415,24 g/mol ; **F =** 236-237 °C ; **m/z** 416 [MH⁺].

RMN ¹H (CDCl₃) : 10,16 ppm : s, 1H, H4 ; 8,59 ppm : d (J = 6,7 Hz), 1H, H16 ; 8,20 ppm : d (J = 9,4 Hz), 1H, H17 ; 8,00 ppm : d (J = 15,7 Hz), 1H, H18 ; 7,53 ppm : m, 3H, H8, H6 et H5 ; 7,42 ppm : m, 1H, H19 ; 6,70 ppm : dd (J = 2,5 Hz et J' = 6,6 Hz), 1H, H11 ; 6,46 ppm : d (J = 2,2 Hz), 1H, H12 ; 4,85 ppm : q (J = 7,5 Hz), 2H, CH₂-N⁺ ; 3,52 ppm : q (J = 6,9 Hz), 4H, 2CH₂ (Et) ; 1,85 ppm : s, 6H, 2CH₃ ; 1,58 ppm : s, 3H, CH₃ (Et) ; 1,29 ppm : t (J = 7,2 Hz), 6H, 2CH₃ (Et).

RMN ¹³C (CDCl₃) : 180,3 ppm : C13 ; 161,2 ppm : C2 ; 158,9 ppm : C9 ; 154,6 ppm : C15 et C20 ; 152,3 ppm : C7 ; 151,0 ppm : C4 ; 143,3 ppm : C11 ; 140,5 ppm : C5 ; 134,6 ppm : C17 ; 129,3 ppm : C18 ; 128,7 ppm : C19 ; 122,8 ppm : C3 ; 113,3 ppm : C16 ; 112,5 ppm : C6 ; 111,0 ppm : C10 ; 108,5 ppm : C12 ; 96,8 ppm : C8 ; 51,7 ppm : C21 ; 45,7 ppm : 2CH₂ (Et) ; 42,9 ppm : CH₂-N⁺ ; 27,7 ppm : 2CH₃ ; 14,1 ppm : CH₃ (Et) ; 12,6 ppm : 2CH₃ (Et).

7-(diéthylamino)-3-(2-(1-éthyl-3,3-diméthylindolin-2-yl)vinyl)-2H-chromèn-2-one



Le borohydrure de sodium (0,028 g, 0,07 mmol) est ajouté par petites fractions à une solution d'iodure de 2-(2-(7-(diéthylamino)-2-oxo-2H-chromèn-3-yl)vinyl)-1-éthyl-3,3-diméthyl-3H-indol-1-ium (0,100 g, 0,2 mmol) dans 3mL d'éthanol anhydre. Le mélange est agité durant 30 min puis l'éthanol est évaporé sous pression réduite. Le résidu est purifié sur système de chromatographie flash (colonne de silice, 4g, 15 μ m) avec comme solvant d'éluion un mélange dichlorométhane/éther de pétrole (3:7 en suivant un gradient jusqu'à 5:5). Les fractions correspondantes au produit sont rassemblées puis évaporées sous pression réduite. Un solide jaune est obtenu (0.026g, 0.06 mmol).

Rendement : 90 % ; **Aspect :** solide jaune ; **Formule brute :** C₂₇H₃₂N₂O₂ ; **Masse molaire :** 416,25 g/mol ; **F** = 145-147 °C ; **m/z** 417 [MH⁺].

RMN ¹H (CDCl₃) : 7,65 ppm : s, 1H, H4 ; 7,27 ppm : d (J = 8,8 Hz), 1H, H5 ; 7,09 ppm : t (J = 7,3 Hz), 1H, H17 ; 7,00 ppm : d (J = 7,0 Hz), 1H, H18 ; 6,69 ppm : d (J = 4,2 Hz), 1H, H6 ; 6,65 ppm : s, 1H, H8 ; 6,58 ppm : dd (J = 2,2 Hz et J' = 6,1 Hz), 1H, H11 ; 6,50 ppm : m, 3H, H12, H16 et H19 ; 3,72 ppm : d (J = 9.3 Hz), 1H, H13 ; 3,42 ppm : qua (J = 7,1 Hz), 4H, 2CH₂ (Et) ; 3,32 ppm : m, 1H, CH₂ (Et) ; 3,12 ppm : m, 1H, CH₂ (Et) ; 1,32 ppm : m, 3H, CH₃ ; 1,22 ppm : t (J = 7.1 Hz), 6H, 2CH₃ (Et) ; 1,10 ppm : m, 3H, CH₃ ; 1,06 ppm : m, 3H, CH₃.

RMN ¹³C (CDCl₃) : 161,6 ppm : C2 ; 155,8 ppm : C9 ; 150,4 ppm : C15 et C7 ; 137,9 ppm : C4 ; 129,4 ppm : C20 ; 128,82 ppm : C5 ; 127,76 ppm : C12 ; 127,46 ppm : C17 ; 121,81 ppm : C19 et C11 ; 117,47 ppm : C18 ; 117,11 ppm : C3 ; 109,05 ppm : C6 et C16 ; 107,25 ppm : C10 ; 97,17 ppm : C13 et C8 ; 44,90 ppm : 2CH₂ (Et) ; 44,54 ppm : C21 ; 39,82 ppm :

CH₂ (Et) ; 25,95 ppm : CH₃ ; 24,31 ppm : CH₃ ; 12,51 ppm : 2CH₃ (Et) ; 10,50 ppm : CH₃ (Et).

Résonnance paramagnétique électronique (RPE)

Appareillage

Les analyses RPE ont été réalisées à température ambiante à l'aide d'un spectromètre Bruker ELEXYS 580-FT, en collaboration avec le Dr Hervé Vezin (Université Lille 1 – UMR CNRS 8516). Les échantillons sont analysés à 298 K avec les paramètres de réglage suivants : puissance 8 mW et 1 G d'amplitude. Les solutions d'échantillons ont été analysées dans une cellule de quartz plate insérée dans une cavité standard. La détection des radicaux hydroxyles (HO°) par RPE a été réalisée à l'aide du piègeur de spins 5,5-diméthyl-1-pyrroline-*N*-oxide (DMPO) fraîchement distillé sous vide, afin d'éliminer les impuretés paramagnétiques. Les solutions aqueuses de H₂O₂ ont été préparées juste avant les analyses grâce à une solution mère de H₂O₂ à 30% (Aldrich). Les solutions stocks de FQ,HCl (1 mM), RQ,2HCl (1 mM), FQ-Me,2HCl (1 mM) et RQ-Me,2HCl (1 mM) ont été préparées dans de l'eau de qualité réactif ACS (attestation de conformité sanitaire).

Préparation des solutions

20 µL de 5,5-diméthyl-1-pyrroline-*N*-oxide à 8 M ont été dilués dans 1 mL de solution de FQ,2HCl à 1 mM (ou RQ,2HCl, FQ-Me,2HCl, RQ-Me,2HCl) puis 50 µL de solution aqueuse de H₂O₂ ont été ajoutés. Les concentrations de 1 mM et 15 mM de H₂O₂ ont été obtenues. Les spectres EPR ont été simulés en utilisant le logiciel Winsim 2002.(1)

Détermination des potentiels de surface électrostatiques moléculaires

La détermination des potentiels de surface électrostatiques moléculaires a été réalisée en collaboration avec le Dr Jean-François Paul (Université Lille 1 - UMR CNRS 8181). Le programme « Amsterdam Density Functional » (ADF) a été utilisé pour réaliser l'ensemble des calculs de potentiel de surface électrostatique moléculaire.(2) Les orbitales moléculaires (OMs) ont été développées en utilisant un set de base TZVP(3). Les géométries ont été optimisées en utilisant la fonctionnelle RPBE(4). Nous avons considéré uniquement l'état de spin singulet pour le Fe(II) et pour le Ru(II). Les calculs de E° ont été réalisés en utilisant le programme ORCA(3). Les énergies des différents états d'oxydation ont été évaluées grâce à la fonctionnelle B3LYP(4, 5) avec le set de base TZVP(3). Afin de prendre en compte le solvant (eau), nous avons utilisé le module Cosmo-rs(6). Les interactions existantes entre les unités de croissance ont été calculées grâce à la mécanique moléculaire. Les énergies conformationnelles ont été minimisées avec le champs de force COMPASS(7), grâce au logiciel Cerius2 (version 4.5)(8). La plupart des paramètres de cette étude ont été déterminés sur la base de calculs *ab-initio*, c'est-à-dire grâce à des méthodes DFT.

Etude conformationnelle par RMN

La conformation de la FQ, la FQ-Me, la RQ et la RQ-Me a été étudiée par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) à l'état liquide. Les expériences RMN ont été enregistrées dans du chloroforme deutéré à 300 K et à une fréquence ^1H de 400 MHz avec l'aide du Dr. Xavier Trivelli (Université Lille 1- UMR CNRS 8576). La concentration dans le tube de RMN des composés est de 10 mM. Les signaux des protons résiduels du solvant deutéré ($\delta(^1\text{H}) = 7,24$ ppm et $\delta(^{13}\text{C}) = 77,2$ ppm) et du TMS (référence) ont été utilisés comme références internes pour les spectres ^1H et ^{13}C . Après avoir fait une attribution complète des signaux RMN ^1H , ^{13}C et ^{15}N . Les interactions non covalentes ont été étudiées par deux types d'expériences : NOESY (= Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy) et HMBC (= Heteronuclear Multiple Bond Correlation).

L'expérience NOESY est une expérience 2D homonucléaire. Elle permet de visualiser l'interaction dipolaire entre protons (nuclear overhauser effect, NOE). Un signal NOE est observé si la distance entre les protons est inférieure à 5 Å. L'expérience NOESY corrèle tous les protons qui sont proches l'un de l'autre. On peut alors observer une corrélation entre des protons qui sont distants d'un point de vue scalaire mais proches dans l'espace.

L'expérience HMBC une expérience 2D hétéronucléaire. Les signaux observés sur un spectre HMBC représentent des couplages scalaires à travers 2, 3 ou 4 liaisons. Chaque signal correspond à la corrélation entre un ^1H et un hétéroatome (ici l'azote ^{15}N) séparés par 2, 3 ou 4 liaisons.

ICP-MS

Les analyses en ICP-MS ont été réalisées par le service des eaux de l'Institut Pasteur de Lille santé, environnement durables Nord.

Préparation des cultures

Les parasites *P. falciparum* de la souche CQ-sensible HB3 proviennent d'une culture maintenue en routine en milieu RPMI 1640 complet (HEPES 25 mM et 300 mg / lL-glutamine; Invitrogen), enrichi avec 10% de sérum humain décomplémenté (AB +), et 6% de globules rouges humains (O +) à 37 ° C sous atmosphère contrôlée (O₂ 5% / 5% de CO₂ / N₂ 90%; Air liquide, Paris, France). Les globules rouges et le sérum ont été fournis par le Centre régional de transfusion Sanguine de Lille, France. Les cultures ont été contrôlées par des frottis minces colorés au Giemsa (Merck, Darmstadt, Allemagne). La parasitémie a été suivie sur 1000 globules rouges. Les essais ont été réalisés sur des cultures asynchrones de *P. falciparum* avec une parasitémie à 10% (majorité de trophozoïtes) et un l'hématocrite de 3%. La RQ (et la RQ-Me) a été ajoutée à une concentration finale de 40 nM. Après 5, 10 ou 15 min de temps d'incubation, 20 µL d'huile de silicone sont ajoutés dans 2,6 mL de culture parasitée (traitée ou non) puis ce mélange est centrifugé à 7,7 tour/min durant 1 min. Le surnageant est placé dans un tube pour analyse (milieu de culture) et le culot est rincé délicatement avec 2,6 mL de milieu de culture (neuf). Après centrifugation, le surnageant est éliminé.

Préparation des solutions pour les analyses

Les culots sont placés dans une solution AAS (qualité analyse en spectrométrie d'absorption) concentrée de HNO₃ (65%) durant une nuit (500 µL). 100 µL de peroxyde d'hydrogène sont ensuite ajoutés puis le volume est fixé à 5 ml par addition d'eau.

Les surnageants sont placés dans une solution AAS concentrée de HNO₃ (65%) pendant une nuit (1 ml). 200 µL de peroxyde d'hydrogène sont ensuite ajoutés et le volume est fixé à 5 ml par addition d'eau. Les échantillons ont été analysés au service des eaux de « l'IPL Santé, Environnement biens durables" (Institut Pasteur de Lille, France) sur un Thermofisher scientifique XSeries II émission avec plasma induit par spectromètre de masse (ICP-MS).

Calculs

Les données obtenues ont ensuite été traitées. La méthode de calcul employée est décrite ci-après, avec comme exemple la RQ après un temps d'incubation de 5 min :

Le culot de la culture parasitée et traitée contient 0,0484 nM de RQ, le surnageant de ce même échantillon contient 0,0678 nM de RQ.

Le pourcentage de RQ contenu dans le culot par rapport à l'échantillon total est donc de :

$$(0,0484 / (0,0484 + 0,0678)) * 100 = 42\%$$

Le pourcentage de RQ contenu dans le surnageant par rapport à l'échantillon total est donc de 58 %.

De la même manière, on détermine que le pourcentage de RQ contenu dans la culture saines traitées est de 25% dans le culot et de 75% dans le surnageant.

Comme vu précédemment, dans le culot de culture parasitée et traitée contient des GRP, des GRS, des GRP-Ru et des GRS-Ru. La quantité de ruthénium contenue dans les GRP et les GRS est négligeable. Il reste donc des GRP-Ru et des GRS-Ru dans un même culot. Nous avons considéré que la RQ entre de manière identique dans les globules rouges sains de la culture saine que les globules rouges sains de la culture parasitée. De ce fait, le pourcentage de globules rouges parasités contenant du Ru est donc de $42 - 25 = 17\%$.

Le volume total de l'échantillon est de 2,6 mL soit 2600 μ L.

L'hématocrite étant de 3%, le volume de globule rouge présent dans l'échantillon est de : $2600 * 0,03 = 78 \mu$ L.

Le volume de milieu de culture (hors globules rouges) est donc de :

$$2600 - 78 = 2522 \mu$$
L.

En tenant compte des résultats obtenus pour la culture saine traitée et si l'on exprime le pourcentage pour 1 μ L de culture, alors on obtient 0,75 μ L de RQ dans 1261 μ L de milieu de culture. Soit $0,75/2522 = 0,0002974$.

La parasitémie étant de 4%, le volume d'hématies saines par échantillon de 2600 μL est de $78 \times 0,96 = 74,88 \mu\text{L}$. On a donc $0,25/74,88 = 0,00334$.

La parasitémie étant de 4%, le volume de globules rouges parasités par échantillon de 2600 μL est de $78 \times 0,04 = 3,12 \mu\text{L}$.

On a donc 0,17 μL de RQ dans 3,12 μL de culot, soit $0,17/3,12 = 0,05449$.

Le ratio de la concentration de RQ dans les globules rouges parasités par rapport au milieu de culture est donc de : $0,05449/0,0002974 = 183$.

Le ratio de la concentration de RQ dans les globules rouges parasités par rapport aux hématies saines est donc de : $0,05449/0,00334 = 17$.

Des calculs identiques ont été réalisées avec la RQ-Me. Les calculs ont été effectués sans arrondir les valeurs (exemple : le pourcentage de globules rouges parasités est de 17,15%).

Synchrotron ESRF

Les analyses réalisées par fluorescence des rayons X basé sur la spectroscopie synchrotron ont été réalisées à l'ESRF (Grenoble, France), en collaboration avec le Dr Sylvain Bohic.

Nous avons bénéficié d'un financement total pour réaliser ces expériences, suite au dépôt et à l'acceptation de la proposition : « Antimalarial drug localization in *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes » n° MD-592.

Préparation des cultures

Les échantillons de cultures utilisés lors de ces expériences proviennent de cultures de *P. falciparum* maintenues en routine dans le laboratoire INSERM U1019, UMR CNRS 8024 du Dr Jamal Khalife. Les souches CQ-sensible HB3 et CQ-résistante W2 de *P. falciparum* ont été maintenues dans un milieu composé de RPMI 1640 (25 mM HEPES et 300 mg/l de L-glutamine) enrichi par 10% de sérum humain décomplémenté et 6% de globules rouges humains (O⁺), conservé dans un étuve à 37°C sous atmosphère contrôlée (O₂ 5% / CO₂ 5% / N₂ 90%). La parasitémie a été suivie sur 1000 globules rouges. Les essais ont été réalisés sur des cultures asynchrones de *P. falciparum* avec une parasitémie à 10% (majorité de trophozoïtes) et un l'hématocrite de 3%. La RQ (la FQ ou la CQ) a été ajoutée à une concentration finale de 40 nM. Après 30 min de temps d'incubation, nous avons immédiatement procédé au dépôt sur les supports en nitrure de silicium.

Dépôt et fixation sur les supports

Les supports utilisés lors de ces analyses sont des fenêtré à membrane de nitrure de silicium standard d'épaisseur 500 nm.

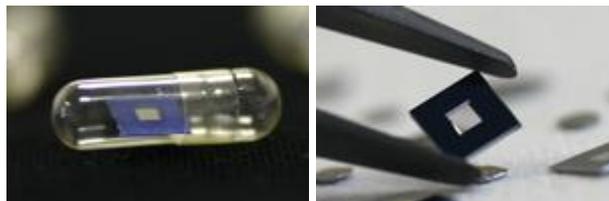


Figure : Fenêtré à membrane de nitrure de silicium

Les dépôts ont été réalisés en condition stériles. Dès la fin du temps d'incubation, le milieu de culture est centrifugé puis le surnageant est éliminé. 2 μL du culot résultant sont déposés sur la surface du support à l'aide d'une pipette automatique, en veillant à ne pas toucher la surface de la fenêtre. 2 μL de méthanol sont ensuite déposés à la surface puis l'excédent de liquide est aspiré avec du coton. La surface est ensuite rincée deux fois avec 2 μL d'eau distillée.

Mise œuvre des expériences synchrotron

Les expériences de fluorescence des rayons X par rayonnement synchrotron ont été effectuées sur la ligne ID22NI de l'European Synchrotron Radiation Facility (ESRF; Grenoble, France). Un système de miroirs courbés multicouches et positionnés dans la géométrie Kirkpatrick-Baez a été utilisé pour focaliser le faisceau de rayons X à une taille de spot d'environ 80 nm² sur l'échantillon. Les régions d'intérêts ont été choisies en utilisant un microscope optique, ce qui a ensuite permis de contrôler la position du faisceau sur l'échantillon. Les analyses des échantillons ont été réalisées à température ambiante et à l'air, le balayage de la zone a été réalisé avec un pas de 100 nm dans le plan focal, le spectre de fluorescence X a été enregistré avec un détecteur en dispersion d'énergie (SII nanotechnologie vortex, 50 mm² zone sensible) placé dans le plan horizontal du faisceau synchrotron émis et à un angle de 75 ° par rapport au faisceau incident sur l'échantillon. Le temps d'intégration par point de balayage est de 1 seconde. Le temps de normalisation contre les variations de l'intensité du faisceau synchrotron incident a été obtenu en utilisant un détecteur diode PIN en silicium, en aval. Cinq images de cellules ont été obtenues pour chacune des conditions décrites, ce qui a permis de générer une image spectrale pixel par pixel fournissant ainsi les cartes topographiques des éléments étudiés. Le spectre complet de la fluorescence a été ajusté pour chacun des points en utilisant le logiciel Pymca. La quantification a été réalisée en utilisant la méthode du paramètre fondamental révisée et élargie dans le logiciel Pymca. Les matériaux de référence standard SRM1832 (standard à couche mince) et SRM1577b (foie de bovin) ont été utilisés pour calibrer les paramètres expérimentaux. Le faisceau de photons X incidents d'énergie 29 keV n'est pas absorbé par les cellules et donc limite la dose déposée dans l'échantillon, toutefois le très haut flux de photons obtenu et le temps relativement long d'analyse entraîne un endommagement de la cellule a posteriori. En effet l'image de fluorescence X présente une surface similaire à la cellule originale, l'analyse sur ces échantillons secs progressant plus vite que les dommages radio-

induits par le faisceau intense de rayon X. Notons que la cellule peut difficilement être analysée une deuxième fois.

Etude de modélisation des fluoroquinolones

Alignement de séquences

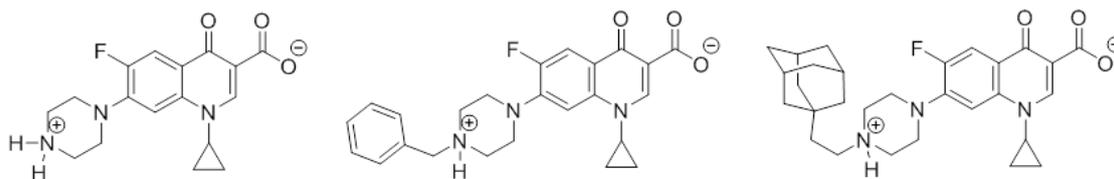
Les séquences de l'ADN gyrase de *P. falciparum* et de *T. gondii* ont été obtenues à partir de la base de données Tr-EMBL. Le serveur NCBI-Blast de l'EBI (European Bioinformatics Institute) (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/ncbiblast/>) a été utilisé pour rechercher la séquence de topoisomérase la plus proche dans la banque de données de protéine RCSB. La structure rayon X du complexe ternaire, composé de la ciprofloxacine, de l'atome de magnésium et de l'ADN gyrase de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) a été utilisée comme modèle du complexe. Le degré d'identité de séquence (31%) entre l'ADN gyrase et la topoisomérase II de *S. aureus* indique que cette structure (code PDB: 2XCT) est un bon modèle et peut être utilisée. Les alignements de séquences des ADN gyrases A et B de *P. falciparum* et *T. gondii* avec les protéines correspondantes de *S. aureus* ont été effectués à l'aide du logiciel ClustalW7, puis affinée manuellement.

Modèle des ADN gyrases de *P. falciparum* et *T. gondii*

La reconstruction des protéines a été réalisée sur la séquence entière grâce au logiciel Modeller (version 9.88). Toutes les molécules présentes dans le fichier pdb 2XCT ; c'est-à-dire les différents brins d'ADN, les deux ciprofloxacines, les deux ions magnésium et les chaînes protéiques ; ont été modélisées. Les modèles finaux ont été sélectionnés parmi ceux ayant obtenu le meilleur score d'énergie.

Préparation des ligands

Selon le pH du milieu, la ciprofloxacine et ses dérivés peuvent exister sous trois formes chimiques distinctes : la forme cationique, la forme anionique et la forme zwitterionique. Pour la ciprofloxacine, les valeurs expérimentales des pK_{a1} et pK_{a2} sont respectivement de 5,9 et 8,29. Pour le dérivé benzylique, les valeurs prédites des pK_{a1} et pK_{a2} sont 5,7 et 6,7. Pour le dérivé adamantylique, les valeurs prédites des pK_{a1} et pK_{a2} sont 5,7 et 7,6. A pH physiologique, les ligands sont donc majoritairement sous forme zwitterionique. Ces formes ont donc été utilisées lors des calculs de docking. La structure 3D et la minimisation d'énergie ont été réalisées grâce au logiciel MOPAC2009.(9)



Formes zwitterioniques de la Cipro, de la Cipro-Bz et de la Cipro-Ad

Protocole de docking

Grâce à l'utilisation du logiciel AutoDock(10) (version 4.2), la ciprofloxacine et ses dérivés ont été « dockés » dans le QRDR (région correspondante à la résistance aux quinolones) des ADN gyrases modélisées par homologie. Les angles de torsions flexibles des ligands ont été attribués avec Autotors. Tous les types d'atome présents dans le ligand, sont placés sur une grille grâce au programme Autogrid. La taille de la grille a été fixée à 30×30×48 points espacés de 0,375 Å. La « boîte » de docking ainsi créée est centrée dans le QRDR. La conformation des ligands a été déterminée grâce à un algorithme génétique Lamarckien.

Synchrotron Elettra

Les analyses réalisées par fluorescence des rayons X basé sur la spectroscopie synchrotron ont été réalisées à Elettra (Trieste, Italie), en collaboration avec le Dr Alessandra Gianoncelli.

Nous avons bénéficié d'un financement total pour réaliser ces expériences, suite au dépôt et à l'acceptation de la proposition : « Fluorine: A new way to locate the antimalarial drugs in *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes » n° 20105261.

Préparation des cultures

Les échantillons de cultures utilisés lors de ces expériences proviennent de cultures de *P. falciparum* maintenues en routine dans le laboratoire INSERM U1019, UMR CNRS 8024 du Dr Jamal Khalife. Les souches CQ-sensible HB3 et CQ-résistante W2 de *P. falciparum* ont été maintenues dans un milieu composé de RPMI 1640 (25 mM HEPES et 300 mg/l de L-glutamine) enrichi par 10% de sérum humain décomplémenté et 6% de globules rouges humains (O⁺), conservé dans un étuve à 37°C sous atmosphère contrôlée (O₂ 5% / CO₂ 5% / N₂ 90%). La parasitémie a été suivie sur 1000 globules rouges. Les essais ont été réalisés sur des cultures asynchrones de *P. falciparum* avec une parasitémie à 10% (majorité de trophozoïtes) et un l'hématocrite de 3%. La CIPROEt (CIPRO-benzyle, CIPRO-Fc ou CIPRO-Ad) a été ajoutée à une concentration finale de 40 nM. Après 24h ou 48h de temps d'incubation, nous avons immédiatement procédé au dépôt sur les supports en nitrure de silicium.

Dépôt et fixation sur les supports

Les supports utilisés lors de ces analyses sont des fenêtre à membrane de nitrure de silicium standard d'épaisseur 200 nm.

Les dépôts ont été réalisés en condition stériles. Dès la fin du temps d'incubation, le milieu de culture est centrifugé puis le surnageant est éliminé. 2 µL du culot résultant sont déposés sur la surface du support à l'aide d'une pipette automatique, en veillant à ne pas toucher la surface de la fenêtre. 2 µL de méthanol sont ensuite déposés à la surface puis l'excédent de liquide est aspiré avec du coton. La surface est ensuite rincée deux fois avec 2 µL d'eau distillée.

Mise œuvre des expériences synchrotron

Les expériences de fluorescence des rayons X par rayonnement synchrotron ont été effectuées sur la ligne TWINMIC de Elettra (Trieste, Italie).

La ligne TWINMIC consiste essentiellement en trois composants optiques qui permettent de focaliser le faisceau vers une source secondaire adaptable pour différents modes d'imagerie et de spectromicroscopie. La ligne de lumière est composée d'un monochromateur à angle plan variable du type SX-400 qui permet de travailler à des énergies allant de 400 à 2200 eV avec une résolution de haute énergie (100 nm). La station expérimentale est un microscope à transmission de rayons X, le microscope TwinMic, qui combine en un seul instrument deux modes de fonctionnement (l'imagerie plein champ et un mode de transmission à balayage) avec un passage aisé entre l'un et l'autre mode.

Les régions d'intérêts ont été préalablement sélectionnées en utilisant un microscope optique, puis grâce au mode de transmission à balayage du microscope TwinMic. Les analyses des échantillons ont été réalisées à température ambiante et sous vide ($1 \cdot 10^{-6}$ mbar), le spectre de la fluorescence d'émission a été enregistré avec un ensemble de huit détecteurs silicium à dispersion d'énergie avec une largeur à mi-hauteur (FWHM) de 135 eV à 5,9 keV et une efficacité de 90% par rapport à toute la gamme d'énergie. Le spectre complet de la fluorescence a été ajusté pour chacun des points en utilisant le logiciel Pymca. La quantification a été réalisée en utilisant la méthode du paramètre fondamental révisée et élargie dans le logiciel Pymca. Des variations de température importantes ont été rencontrées durant les expériences, ce qui a engendré des déplacements importants du faisceau durant les analyses, de ce fait, le temps d'acquisition pixel par pixel a été ajusté selon la température extérieure : plus la température est élevée, plus la durée d'acquisition est faible.

Cytotoxicité

Les cellules 3T6 de souris ont été cultivées dans du DMEM supplémenté avec 10% de sérum fœtal de bovin inactivé (Invitrogen, Merelbeke, Belgique), dans un incubateur à CO₂ (37°C, 5% de CO₂). 200 µl de cellules 3T6 trypsinisées (5x10³) ont étéensemencées dans chacun des puits (à l'exception des puits sur le bord) d'une plaque de 96 puits. Dans des conditions stériles, 8 dilutions successives de chaque composé ont été réalisées (de 100µM à 0,05µM). Après 24 h d'incubation, le milieu de culture a été éliminé et remplacé par 198 µl de milieu de culture frais et 2 µl de la solution du composé. 200 µL de milieu de culture ont également été ajoutés aux lignes de cellules contrôles. Les puits témoins-solvants ont reçu 200 µL d'un mélange de solvant (DMSO, Sigma Aldrich) et de milieu de culture. Après 48 heures d'incubation, les cellules ont été soigneusement lavées avec du PBS et 100 µl de milieu de culture frais a été ajouté dans chaque puits. 10 µl de MTT (kit de test *in vitro* de toxicologie, MTT base, Sigma-Aldrich, Bornem, Belgique) a ensuite été ajouté à tous les puits, et incubés pendant 3 heures. Le réactif de solubilisation MTT a ensuite été ajouté dans chaque puits afin de solubiliser les cristaux de formazan. La plaque a été incubée pendant une nuit à 37°C. Avec un lecteur de microplaques, la densité optique de chaque puits a été mesurée à 540 nm pour l'absorbance de fond dont le filtre de référence a été fixé à 690 nm.

Calculs

Les pourcentages d'inhibition de la prolifération cellulaire ont été calculés selon la formule:

$$\% \text{ IC} = 100 - [\text{DO moyenne corrigée de l'échantillon} \times 100 / \text{DO moyenne corrigée des témoins avec solvant}]$$

où % IC est le pourcentage d'inhibition de la prolifération cellulaire et la DO moyenne corrigée de l'échantillon / DO solvant = moyenne DO₅₄₀-DO₆₉₀ des échantillons et des contrôles. Pour chaque composé, le pourcentage d'inhibition de l'activité a été tracé en fonction de la concentration du composé étudié. La concentration à 50% d'inhibition de la prolifération cellulaire (CI₅₀) a été calculée en localisant les valeurs d'axe x correspondant à la moitié des valeurs d'absorbance.

Stabilité des esters

Les taux d'hydrolyse enzymatique des prodrogues esters éthyliques (Cipro-Et, Cipro-Fc, Cipro-Bz et Cipro-Ad) ont été étudiés dans du milieu de culture RPMI supplémenté avec 10% de sérum humain. Ces études ont été réalisées dans un bain thermostaté à 37 °C avec un suivie sur 76 heures. Les réactions ont été initiées par la dissolution d'une solution stock à 1 mM de prodrogue dans une solution de milieu de culture (RPMI) contenant 10% de DMSO préalablement chauffée à 37°C. Les solutions finales à 100 µM en prodrogue ont ensuite été placées dans un bain d'eau thermostaté à 37 ° C durant toute la durée de l'expérience. Les fractions de 100 µL de solution de prodrogue ont été recueillies à des moments différents (t = 0 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 3 ; 4 ; 5 ; 6 ; 8 ; 10 ; 12 ; 14 ; 16 ; 18 ; 20 ; 24 ; 28 ; 32 ; 36 ; 40 ; 44 ; 48 ; 52 ; 56 ; 60 ; 64 ; 68 ; 72 et 76 h).

Dès le prélèvement, 100 µL d'éthanol ont été ajoutés à la fraction de 100 µL de solution de prodrogue, puis le mélange a été centrifugé durant 1 min à 8000 tours/min. Le surnageant est directement injecté à travers une boucle d'injection de 50 µL pour l'analyse HPLC. Les solvants de la phase mobile sont : (A) solution aqueuse à 0,05% d'acide trifluoroacétique (TFA), (B) une solution contenant 0,05% de TFA, 20% H₂O et 80 % de CH₃CN. Les conditions suivantes ont été utilisées : (A) 100% durant 5 min, puis un gradient linéaire de (A) à (B) de 0-100% pendant 30 min, puis (A) 100% durant 5 min. Les temps de rétention HPLC (HPLC tR) ont été obtenus à des débits de 1 mL/min.

En présence de sérum humain les temps de rétention obtenus sont :

Composés	tR
Cipro	15,47 min
Cipro-Et	17,53 min
Cipro-Fc	24,04 min
Cipro-Bz	17,63 min
Cipro-Ad	26,42 min

Temps de rétention HPLC de la Cipro, de la Cipro-et, de la Cipro-fc, de la Cipro-benz et de la Cipro-ad.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Duling, D. R. (1994) Simulation of multiple isotropic spin-trap EPR spectra, *J Magn Reson B* 104, 105-10.
2. Te Velde, G., Bickelhaupt, F. M., Baerends, E. J., Fonseca Guerra, C., van Gisbergen, S. J. A., Snijders, J. G., et Ziegler, T. (2001) Chemistry with ADF, *J. Comput. Chem.* 22, 931-967.
3. Schäfer, A., Huber, C., et Ahlrichs, R. J. (1994) Fully optimized contracted Gaussian basis sets of triple zeta valence quality for atoms Li to Kr, *J. Chem. Phys.* 100, 5829-5835.
4. Perdew, J. P., Burke, K., et Ernzerhof, M. (1996) Generalized Gradient Approximation Made Simple, *Phys Rev Lett* 77, 3865-3868.
5. ORCA. <http://www.thch.uni-bonn.de/tc/orca/>.
6. Sinnecker, S., Rajendran, A., Klamt, A., Diedenhofen, M., et Neese, F. (2006) Calculation of solvent shifts on electronic g-tensors with the conductor-like screening model (COSMO) and its self-consistent generalization to real solvents (direct COSMO-RS), *J Phys Chem A* 110, 2235-45.
7. Sun, H. (1998) COMPASS: An ab Initio Force-Field Optimized for Condensed-Phase Applications Overview with Details on Alkane and Benzene Compounds, *J. Chem. Phys. B* 102, 7338-7364.
8. (2000) Cerius2 v. 4.5, San Diego.
9. MOPAC2009, J. J. P. S.
10. Morris, G. M., Huey, R., et Olson, A. J. (2008) Using AutoDock for ligand-receptor docking, *Curr Protoc Bioinformatics Chapter 8*, Unit 8 14.

ANNEXES

Spectrométrie de Masse à source Plasma à Couplage Inductif : ICP-MS

L'ICP-MS a été choisi comme méthode de quantification pour sa sensibilité. En effet, les limites de détection de ce type d'appareillage est de l'ordre du ng.L^{-1} . Ceci est surtout valable pour des éléments peu abondants, tel que le Ruthénium et étant très peu interféré. En effet, l'emploi de la CCT (collision cell technology) permet d'éviter la formation de polyatomiques pouvant avoir le même rapport m/z que l'élément recherché.

I. Principe

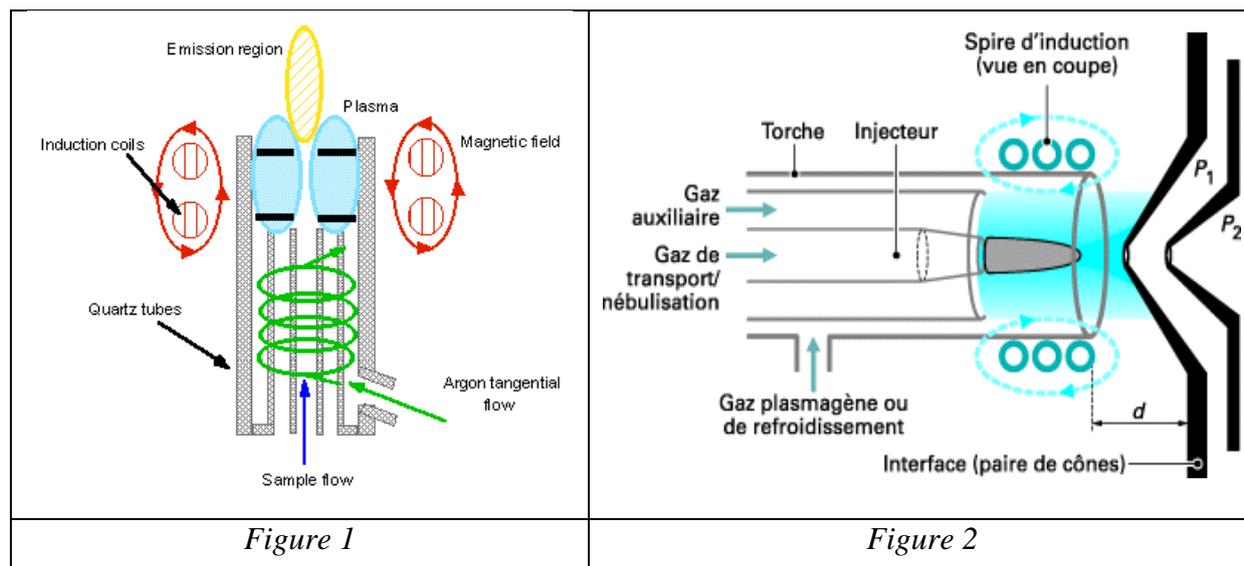
I.1. Système d'introduction de l'échantillon

Formation du plasma à couplage inductif (ICP)

L'état plasma, également appelé « 4^{ème} état de la matière » est un état particulier dans lequel la matière correspond à un gaz partiellement ionisé et électriquement neutre du point de vue macroscopique (équilibre entre particules chargées et électrons libres).

La torche à plasma est composée de trois tubes concentriques en quartz, qui est un matériaux isolant et réfractaire. Le gaz plasmagène utilisé est l'argon, il a l'avantage de posséder un potentiel d'ionisation élevé (environ 15,76 eV) ce qui va permettre une ionisation plus efficace des éléments passant dans le plasma.

Un courant alternatif à haute fréquence (27,12 MHz) parcourt une bobine d'induction placée autour de la torche. Ce courant va générer un champ magnétique, qui va ensuite induire un courant dans le flux d'argon plasmagène. Ce gaz plasmagène est introduit dans le tube intermédiaire ce qui permet d'éviter tout contact avec la bobine. Lorsqu'une décharge est créée à la sortie de la torche, l'argon plasmagène sera ionisé et passera de l'état gazeux à l'état de plasma. Afin de refroidir la région proche des bobines et d'éviter la détérioration du plasma, un flux d'argon tangentiel est injecté via le tube externe. L'échantillon sera amené via l'injecteur, qui est le tube interne, grâce à un gaz vecteur : l'argon de nébulisation.



L'échantillon liquide est envoyé, via une pompe, dans un nébuliseur. Un flux très rapide d'argon va permettre la création d'un aérosol. Les plus fines gouttelettes seront ensuite transmises vers la torche à plasma, via la chambre de nébulisation. Lors du passage de l'aérosol au niveau du flux de plasma, l'échantillon en solution, va subir plusieurs modifications jusqu'à l'obtention d'ions. L'échantillon va d'abord être désolvaté (élimination du solvant), avant d'être vaporisé puis d'être dissocié en atomes. La température très élevée du plasma va ensuite exciter et ioniser les atomes (Fig1).

Détection

Les ions sont ensuite amenés vers le détecteur. Le passage dans deux cônes successifs en nickel. Le premier cône va permettre d'extraire les ions de plasma grâce à un vide poussé qui va créer un jet supersonique. Le second cône va permettre de diriger le jet supersonique vers l'optique ionique, afin de focaliser le flux d'ions (Fig 2).

Filtre quadripolaire

Le filtre quadripolaire est un filtre de masse qui va permettre de « trier » les ions selon leur rapport masse sur charge (m/z). Le quadripôle permet la transmission des seuls ions de rapport m/z (les conditions d'ionisation, « puissance, tension ..etc doivent permettre d'obtenir une charge $z = 1$) désiré, vers le détecteur. Les ions sélectionnés sont alors focalisés sur un

détecteur de type multiplicateur d'électrons à dynodes discrètes. Le signal enregistré est ensuite traité par un système informatique.

Fluorescence X par rayonnement synchrotron

I. Généralités

Le rayonnement synchrotron a été observé pour la première aux Etats-Unis en 1946 (et annoncé en 1947), dans un synchrotron de la General Electric(1), lors d'études portant sur des interactions de particules. Bien que le rayonnement synchrotron soit aujourd'hui considéré comme un outil de recherche indispensable, notamment en biologie et chimie de surface, il a tout d'abord été vu comme une nuisance entraînant la perte de vitesse des particules étudiées. Ce n'est que dans les années 1960, qu'il a été reconnu comme un outil exceptionnel(2).

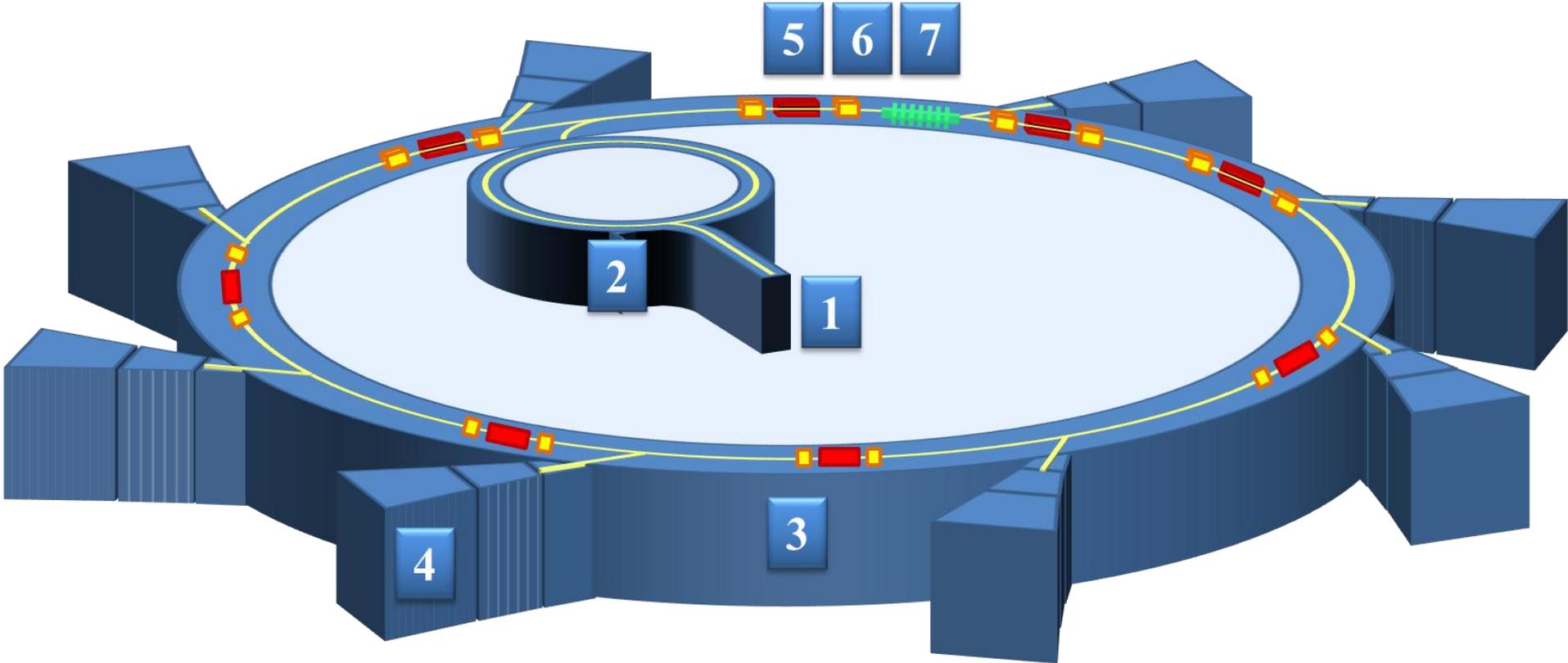
Aujourd'hui, il existe une cinquantaine d'installations dans le monde, spécialement dédiées à l'usage du rayonnement synchrotron.

Le rayonnement synchrotron est utilisé dans de nombreux domaines d'application tels que la chimie, la physique, la biologie, la médecine, les sciences de la vie et de la terre, la métallurgie...

II. Principe

D'après les équations de Maxwell, le déplacement d'une particule chargée sur une orbite circulaire engendre une accélération centripète. Cette accélération génère l'émission d'un rayonnement. De ce fait, lors de l'accélération d'un électron, une partie de l'énergie fournie est perdue sous forme de rayonnement électromagnétique. Lorsque les électrons atteignent des vitesses proches de celle de la lumière, les pertes dues au rayonnement, appelé "rayonnement synchrotron", deviennent alors importantes. Ce phénomène sera plus important dans les accélérateurs cycliques que dans les accélérateurs linéaires. C'est pourquoi les électrons sont accélérés dans un synchrotron de forme circulaire.

Production et fonctionnement du synchrotron



1. LE LINAC

Après avoir été émis par un canon, les électrons sont accélérés dans un accélérateur linéaire appelé le Linac. Durant cette phase, les électrons atteignent une vitesse d'environ 200 MeV.

2. LE BOOSTER

Les électrons entrent ensuite dans le booster où ils vont passés de 200 MeV à environ 6 GeV. C'est lors de cette accélération que les caractéristiques du faisceau (taille, dispersion en énergie,...) vont être établies.

3. L'ANNEAU DE STOCKAGE

Les électrons sont ensuite transférés vers l'anneau de stockage où ils tourneront durant plusieurs heures à une vitesse proche de celle de la lumière. L'anneau n'est pas parfaitement circulaire, en effet, il est en fait composés de divers éléments droits et courbes. Durant cette étape, les électrons subissent des accélérations dans les dipôles et les éléments d'insertion, ce qui engendre une perte d'énergie et la production d'un rayonnement électromagnétique appelé le « rayonnement synchrotron ».

4. LES LIGNES DE LUMIERE

Le rayonnement synchrotron ainsi produit est guidé vers une « sortie » appelée « ligne de lumière ». Dans chaque ligne, une suite de différents éléments optiques donne les caractéristiques au faisceau. Chaque ligne étant optimisée selon les expériences à réaliser.

5. LES DIPOLES

Ces éléments également appelés aimants de courbure, génèrent un champ magnétique qui permet d'orienter les électrons selon une trajectoire courbe. Durant cette étape, les électrons perdent de l'énergie et produisent de l'énergie sous forme de lumière. Ces éléments servent donc de guide aux électrons et de source de lumière.

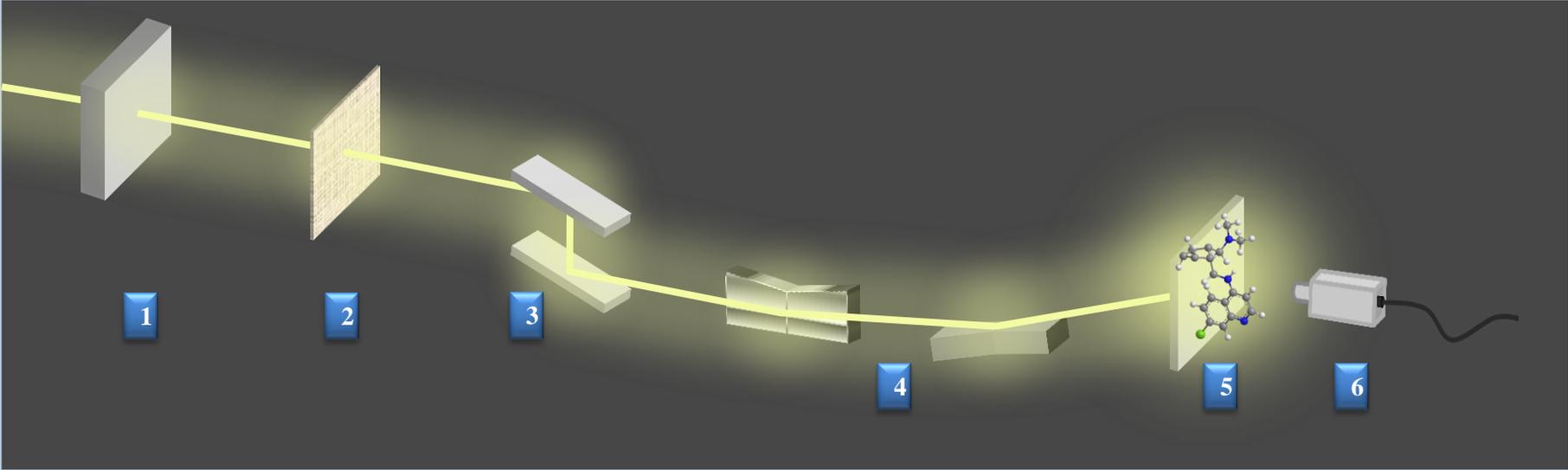
6. LES ELEMENTS MAGNETIQUES DE GUIDAGE

Dans chacune des parties de l'appareil vu précédemment, il existe plusieurs dizaines d'éléments magnétiques qui permettent d'orienter le faisceau. Parmi ces éléments, il y a les aimants de courbure (ou dipôles) qui guident le faisceau et les quadripôles ou sextupôles qui concentrent les particules pour conserver les qualités du faisceau.

7. LES ELEMENTS MAGNETIQUES D'INSERTION

Dans les sections droites de l'anneau de stockage, on retrouve des éléments magnétiques d'insertion (ou onduleurs) qui sont composés d'une série d'aimants de polarité alternée. Cet élément oblige le faisceau à suivre une trajectoire ondulée. Durant le passage des électrons au-dessus de chaque aimant, ils subissent une accélération et donc une production de lumière. Ces systèmes permettent d'obtenir des faisceaux plus

Les lignes de lumière

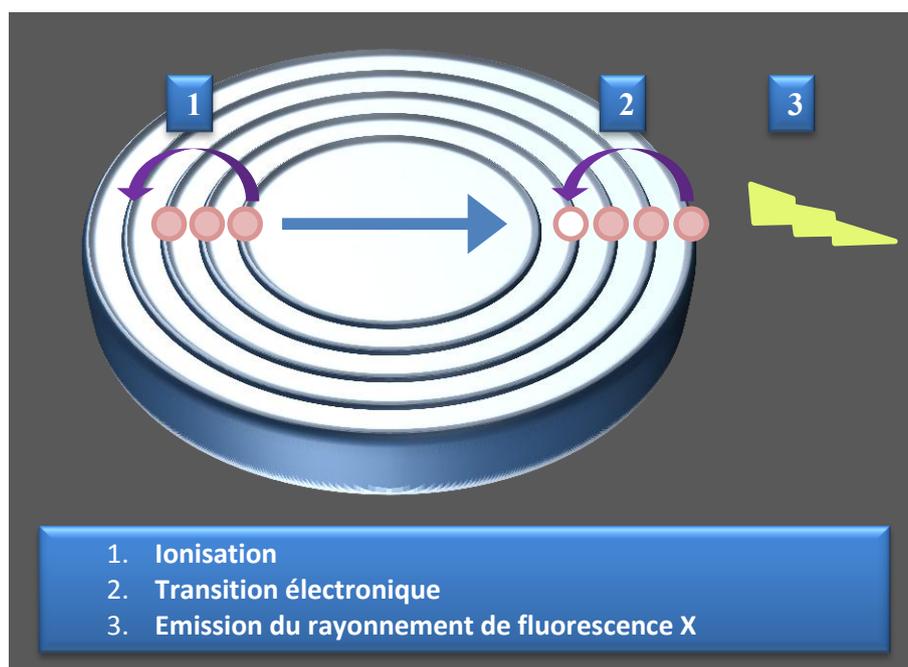


1. Fentes : Les deux fentes permettent de délimiter le faisceau de lumière.
2. Filtre : Le filtre (en aluminium) permet d'absorber les photons de basse énergie (IR et visible) et ainsi réduire l'intensité du faisceau, pour protéger les éléments optiques situés derrière.
3. Monochromateur : C'est grâce à cet élément que va être sélectionné la longueur d'onde qui permettra d'analyser l'échantillon d'intérêt. C'est la position angulaire des deux cristaux composants le monochromateur, qui va permettre d'effectuer les réglages.
4. Miroirs : Deux miroirs successifs placés perpendiculairement permettent de focaliser la lumière vers l'échantillon. Le forme des courbures est gérée par ordinateur afin de régler la distance focale.
5. Echantillon : L'échantillon est placé sur un support qui n'absorbe pas les rayons X (Nitrure de silicium) et qui va réagir en fonction de l'énergie sélectionnée.
6. Détecteur : Le détecteur va permettre l'enregistrement de la réponse de l'échantillon. Le détecteur utilisé dépendra du type d'analyse effectuée.

III. Fluorescence X

Principe

Lorsqu'un échantillon est soumis à un rayonnement de forte énergie, tel que les rayons X), les atomes le constituant subissent une ionisation. Ce phénomène entraîne la perte d'un ou plusieurs électrons situés dans les couches internes de cet atome. La lacune électronique ainsi générée va entraîner l'instabilité de l'atome et conduire à la transition électronique d'un électron d'une couche externe vers la case quantique vide. Lors de cette désexcitation, il y aura émission d'un rayonnement dit de fluorescence X. Les raies spectrales ainsi émises seront annotées selon la notation de Siegbahn K, L, M... selon le niveau d'excitation de la couche électronique.



Selon la relation de Planck-Einsten, l'énergie du rayonnement X émis $h\nu$, correspond à la différence d'énergie (ΔE) de liaison entre les niveaux électroniques. Cette énergie est donc caractéristique de l'atome excité et s'écrit :

$$h\nu = \Delta E = |E_x| - |E_y|$$

où h est la constante de Planck

ν est la fréquence du rayonnement émis

E_x est l'énergie de liaison de l'électron de la couche excitée

E_y est l'énergie de liaison de l'électron de la couche externe.

Des tables regroupent les énergies de toutes les raies de tous les éléments permettant d'identifier aisément les numéros atomiques Z des éléments qui constituent l'échantillon.

On parle de fluorescence lorsque le rayonnement réémit est moins énergétique que l'absorption du rayonnement de départ. De ce fait, il est nécessaire de fournir une énergie au moins égale à $|E_x|$ pour provoquer l'émission d'une raie d'énergie $h\nu$ de l'atome concernée.

L'utilisation d'un rayonnement synchrotron focalisé permet la reconstruction d'images de distribution des éléments chimiques par spectrométrie d'émission X à l'échelle microscopique.

Références bibliographiques

1. Elder, F., Gurewitsch, A., Langmuir, R., et Pollock, H. (1947) Radiation from Electrons in a Synchrotron, *Physical Review* 71, 829-830.
2. Tombouliau, D., et Hartman, P. (1956) Spectral and Angular Distribution of Ultraviolet Radiation from the 300-Mev Cornell Synchrotron, *Physical Review* 102, 1423-1447.

LISTE DES TRAVAUX

PUBLICATIONS

1. Iminosugar-ferrocene conjugates as potential anticancer agents. Hottin, A., Dubar, F., Steenackers, A., Delannoy, P., Biot, C., Behr, J.B., *Org. Biomol. Chem.*, **2012**, 10, 5592-5597 (IF = 3,696).[‡]
2. Opening up the advantages of the ruthenocenic bioprobes of ferroquine: distribution and localization in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. Biot, C., Dubar, F., Khalife, J., Slomianny, C., *Metallomics*, **2012**, 4, 780-783 (IF = 3,592).[‡]
3. Statistical Methodology for the Detection of Small Changes in Distances by EXAFS. Application to the Antimalarial Ruthenoquine. Curis, E., Dubar, F., Nicolis, I., Bénazeth, S. Biot, C., *J. Phys. Chem. A*, **2012**, 116 (23), 5577-5585 (IF = 2,946).[‡]
4. Deciphering the Resistance-Counteracting Functions of Ferroquine in Plasmodium falciparum-Infected Erythrocytes. Dubar, F. Bohic, S. Dive, D. Guérardel, Y. Cloetens, P. Khalife, J. Biot, C. *ACS Med. Chem. Lett.*, **2012**, 3 (6), 480-483 (IF = 3,355).[‡]
5. Paludisme Recherche de nouvelles approches thérapeutiques ciblant l'apicoplaste, un organite cellulaire d'origine algale Biot, C., Botté, C. Y., Dubar, F., Maréchal, E. *Médecine/sciences*, **2012**, 28(2), 163-171, (IF = 0,64).[‡]
6. In situ nanochemical imaging of label-free drugs: a case study of antimalarials in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. Dubar, F. Bohic S., Slomianny C., Morin J.C., Thomas P., Kalamou H., Guérardel Y., Cloetens P., Khalife J., Biot C. *Chem. Commun.*, **2012**, 48, 910-912, (IF = 6,169).[‡]
7. Plasmodium falciparum Apicoplast Drugs: Targets or Off-Targets? Botté, C.Y., Dubar, F., McFadden, G.I., Maréchal, E., Biot, C. *Chem. Rev.*, **2011**, 112(3), 1269-1283, (IF = 40,197).[‡]
8. Ester prodrugs of ciprofloxacin as DNA-gyrase inhibitors: synthesis, antiparasitic evaluation and docking studies. Dubar, F.; Wintjens, R.; Martins-Duarte, E.S.; Vommaro, R.C.; De Souza, W.; Dive, D.; Pierrot, C.; Pradines, B.; Wohlkonig, A.; Khalife, J.; Biot, C. *Med. Chem. Commun.*, **2011**, 2, 430-435, (IF partiel = 2,800).[‡]
9. The Antimalarial Ferroquine: Role of the Metal and Intramolecular Hydrogen Bond in Activity and Resistance. Dubar, F., Egan, T. J., Pradines, B., Kuter, D., Ncokazi, K. K., Forge, D., Paul, J. F., Pierrot, C., Kalamou, H., Khalife, J., Buisine, E., Rogier, C., Vezin, H., Forfar, I., Slomianny, C., Trivelli, X., Kapishnikov, S., Leiserowitz, L., Dive, D., Biot, C. *ACS Chem Biol.*, **2011**, 18, 275-287, (IF = 6,446).[‡]
10. Ferrocene-indole hybrids for cancer and malaria therapy. Quirante, J., Dubar, F., González, A., Lopez, C., Cascante, M., Cortés, R., Forfar, I., Pradines, B., Biot, C. *J. Organomet. Chem.*, **2011**, 693, 1011-1017, (IF = 2,384).[‡]
11. Synthesis and antimalarial activities of rhenium bioorganometallics based on the 4-aminoquinoline structure. Arancibia, R., Dubar, F., Pradines, B., Forfar, I., Dive, D., Klahn, A. H., Biot, C. *Bioorg Med. Chem.*, **2010**, 18, 8085-8091, (IF = 2,921).[‡]
12. Enhancement of the Antimalarial Activity of Ciprofloxacin Using a Double Prodrug/Bioorganometallic Approach. Dubar, F., Anquetin, G., Pradines, B., Dive, D., Khalife, J., Biot, C. *J. Med. Chem.*, **2009**, 52, 7954-7957, (IF = 5,248).^{*}
13. Structure-activity relationships of 4-N-substituted ferroquine analogues. Time to re-evaluate the mechanism of action of ferroquine. Biot, C., Chavain, N., Dubar, F.,

Pradines, B., Trivelli, X., Brocard, J., Forfar, I., Dive, D. *J. Organomet. Chem.*, **2009**, 694, 845-854, (IF = 2,384).*

14. Ferroquine, an Ingenious Antimalarial Drug. Dubar, F., Khalife, J., Brocard, J., Dive, D., Biot, C. *Molecules*, **2008**, 13, 2900-2907, (IF = 2,386).*

≠ articles publiés lors de la thèse

* articles publiés lors du master II

PRESENTATIONS ORALES

1. Accumulation et localisation subcellulaire de la Ferroquine, candidat médicament antipaludique, Dubar, F., Biot, C. 2^{ème} journées du Consortium Anti-Parasitaire. Toulouse, 9-10 février **2012**.[≠]
2. La Ferroquine : relations structure-activité d'un nouveau cheval de Troie, Dubar, F.; Biot, C. 1er Séminaire du Consortium Anti-Parasitaire. Annecy, 24-26 janvier **2011**.[≠]
3. Molecular Docking Studies of Ciprofloxacin Analogues Targeting *Plasmodium falciparum* DNA Gyrase. Wintjens, R.; Dubar, F.; Biot, C. Bioinformatique des *Plasmodium* et autres pathogènes majeurs. Muséum d'Histoire Naturelle, Paris, 22 et 23 Novembre **2010**.[≠]
4. Antimalarial fluoroquinolones: synthesis and potency Dubar, F.; Anquetin, G.; Dive, D.; Khalife, J.; Pradines, B.; Biot, C. Journée scientifique du PRIM (Pôle de recherche Interdisciplinaire pour le Médicament). Lille, 10 mars **2010**.[≠]
5. Bioorganométalliques antipaludiques : analogues de la ciprofloxacine et de la ferroquine. Dubar, F., Biot, C. Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Lille, Décembre 17, **2009**.[≠]
6. N-substituted ferroquine analogues as antimalarial agents: structure activity relationship. Dubar, F.; Chavain, N.; Dive, D.; Pradines, B.; Forfar, I.; Biot, C. Communication-flash, 4th International Conference on Metals and Genetics, Paris, July 21-24, **2008**.*

≠ présentations effectuées durant la thèse

* présentations effectuées durant le master II

POSTERS

1. Distribution and localization of Ferroquine in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes: use of ruthenocenic bioprobes. Dubar, F., Bohic, S., Dive, D., Guérardel, Y., Cloetens, P., Khalife, J., Slomianny, C., Biot, C., 48th International Conference on Medicinal Chemistry - 48èmes Rencontres Internationales de Chimie Thérapeutique (RICT 2012) Poitiers, France - July 4-6, **2012**.[≠]
2. Mécanismes d'action : imagerie de molécules antipaludiques. Dubar, F., Bohic, S., Slomianny, C., Morin, J-C., Thomas, P., Kalamou H., Guérardel, Y., Cloetens, P., Khalife, J., Biot, C., XIXèmes Journées jeunes chercheurs, Biocitech, Romainville. 2-3 Février **2012**. Prix de la meilleure communication par affiche.[≠]
3. Effect of ciprofloxacin derivatives against *Toxoplasma gondii*. Martins-Duarte, E.S.; Dubar, F.; Biot, C.; de Souza, W.; Vommaro, R.C. Meeting of Cell Biology of Pathogens, Sao Paulo, Brazil. August 7th, **2011**.[≠]

4. Anticancer therapy: Ferrocene-Iminosugar Hybrids as Potential Fucosidase Inhibitors. Dubar, F., Kotland, A., Guérardel, Y., Behr, J.-B., Biot, C. Glycolipid European Network (GLEN), Reims, France, November 16-17, **2010**.[‡]
5. *Plasmodium falciparum* DNA gyrase A and its molecular docking study with ciprofloxacin analogues. Dubar, F.; Wintjens, R., Dive, D. and Biot, C. XXIst International Symposium on Medicinal Chemistry (ISMC), Brussels, Belgium, September 5-9, **2010**.[‡]
6. Fucosidase inhibitors as probes for the selective delivery of cytotoxic ferrocene into cancer cells. Kotland, A.; Dubar, F.; Biot, C.; Behr, J.-B. 46ème Rencontre Internationale de Chimie Thérapeutique (RICT), Interfacing Chemical Biology and Drug Discovery. Reims, 30 juin au 02 juillet **2010**.[‡]
7. Antimalarial fluoroquinolones: synthesis and potency Dubar, F.; Anquetin, G.; Dive, D.; Khalife, J.; Pradines, B.; Biot, C. Journée scientifique du PRIM (Pôle de recherche Interdisciplinaire pour le Médicament). Lille, 10 mars **2010**.[‡]
8. News trends for fluoroquinolones with antimalarial activity. Anquetin, G.; Dubar, F.; Dive, D.; Khalife, J.; Pradines, B.; Biot, C. XVIIème Journée Jeunes Chercheurs, Faculté de Pharmacie, Paris, February 5, **2010**.[‡]
9. Analogues ferrocéniques de ciprofloxacin: design, synthèse, activité antipaludique et association. Dubar, F.; Anquetin, G.; Dive, D.; Khalife, J.; Pradines, B.; Biot, C. 23ème Journées Franco-belges de Pharmacochimie, Mons, Belgique, May 28-29, **2009**.^{*}
10. Ferrocenic fluoroquinolones as antimalarial agents. Synthesis and biological evaluation. Dubar, F.; Anquetin, G.; Dive, D.; Khalife, J.; Pradines, B.; Biot, C. 10th Drug Design & Development Seminar **2009**, Rauschholzhausen Castle, Germany, March 19-20, **2009**.^{*}
11. Probing the importance of the intramolecular hydrogen bond interaction in ferroquine. Dubar, F.; Chavain, N.; Dive, D.; Pradines, B.; Brocard, J.; Trivelli, X.; Forfar, I.; Biot, C. Annual One-Day Meeting on Medicinal Chemistry of SRC & KVCV, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium, November 7, **2008**.^{*}
12. 4-N-substituted ferroquine analogues as antimalarial agents: structure activity relationship. Dubar, F.; Chavain, N.; Dive, D.; Pradines, B.; Forfar, I.; Biot, C. 4th International Conference on Metals and Genetics, Paris, July 21-24, **2008**.^{*}

[‡] poster présentés durant la thèse

^{*} poster présentés durant le master II

RESUME

FRANÇAIS

Les apicomplexes sont des organismes intracellulaires intervenant dans de nombreuses pathologies humaines. Parmi celles-ci le fléau du paludisme continue de tuer plus de 600000 personnes chaque année. Malgré tous les efforts déployés par les autorités de santé, le parasite du paludisme a développé de nombreuses résistances à tous les antipaludiques. Les alternatives aux traitements actuels sont donc très attendues. Le développement efficace de nouvelles molécules doit passer par la compréhension complète des mécanismes d'action des molécules actuelles et par la connaissance des mécanismes de résistance développés par le parasite. Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à la compréhension du mécanisme d'action de la Ferroquine, un candidat médicament en développement par la Sanofi. Nous avons étudié l'impact de sa structure originale et de ses propriétés physico-chimiques sur son activité antipaludique. D'autre part, des études d'imagerie ont permis d'étudier l'accumulation et la localisation de cette molécule. Dans une seconde partie, nous nous sommes intéressés au développement d'analogues de la ciprofloxacine. Dans des études antérieures de pharmacomodulation ont montré que la transformation de la ciprofloxacine en prodrogue et l'insertion d'un ferrocène dans sa structure permettent une augmentation de l'activité. Ces travaux de thèse ont permis d'étudier l'influence du ferrocène sur l'activité de ces molécules. Des études d'imagerie ont également été mises en oeuvre sur cette famille de composés.

ANGLAIS

Apicomplexa parasites are intracellular organisms involved in many human diseases. Among them the scourge of malaria continues to kill over 600,000 people each year. Despite all efforts of health authorities, the malaria parasite has developed resistance to all antimalarial drugs and alternatives to current treatments are eagerly awaited. The development of effective new drugs must go through a complete understanding of molecular mechanisms of action of current drug and knowledge of resistance mechanisms developed by the parasite. In this thesis, we were interested in understanding the mechanism of action of Ferroquine, a drug candidate in development by Sanofi. We studied the impact of its original structure and its physico-chemical properties on its antimalarial activity. On the other hand, imaging studies have investigated the accumulation and localization of this molecule. In the second part, we were interested in developing analogues of ciprofloxacin. Previous pharmacomodulation studies showed that the transformation of ciprofloxacin into a prodrug and the insertion of a ferrocene into its structure allow an increase in activity. This thesis has investigated the influence of ferrocene on the activity of these molecules. Imaging studies were also carried out on this family of compounds.