

50376

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE - FLANDRES - ARTOIS

345

50376
1987
345

THESE

pour obtenir le Diplôme de Docteur
de l'Université

par



Mode d'action des antimalariques :
Détermination des sites de concentration des amino-4 quinoléïnes
et des compartiments acides parasitaires chez des souches
de Plasmodium berghei sensibles et résistantes à la chloroquine.

Présentée le 27 Novembre 1987 devant la
Commission d'examen

Jury

MM B. FOURNET	Président
P. CHARET	Rapporteur
D. WARHURST	Rapporteur
D. CAMUS	Examineur
G. GRIFFITHS	Examineur
S. MOREAU	Examineur
A. VERNES	Examineur

SCD LILLE 1

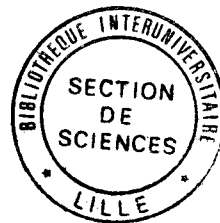


D 030 322729 9

50376
1987
345

50376
1987
345

Ce travail a été réalisé à l'Unité de Biologie et de Biochimie Parasitaires et Fongiques de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (I.N.S.E.R.M. - U 42).



77 545
036 49 377

A mes parents,

en témoignage de ma profonde affection.

A Ammar, mon mari,

avec tout mon amour.

A mes beaux-parents,

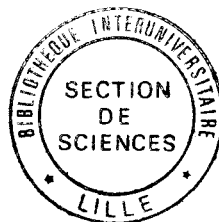
en témoignage de l'amour que je leur porte.

A ma soeur et à mes frères,

je leur dédie ce travail en signe des profonds sentiments fraternels que je ressens.

A ma famille,

A mes amis.



Je remercie Monsieur le Professeur B. FOURNET, de l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider le Jury de cette thèse.

Qu'il veuille trouver, ici, le témoignage de ma respectueuse reconnaissance.

Je remercie Monsieur le Professeur P. CHARET, d'avoir accepté d'être le rapporteur de cette thèse.

Qu'il soit assuré de ma profonde gratitude.

Je remercie Monsieur le Professeur D. WARHURST, d'avoir accepté de juger ce travail.

Je suis particulièrement sensible à l'honneur que me fait Monsieur le Professeur A. VERNES, en acceptant de participer à ce Jury, malgré ses nombreuses charges.

J'aimerais qu'il trouve, ici, l'expression sincère de la reconnaissance que je lui témoigne.

Je remercie Monsieur le Professeur G. GRIFFITHS, d'avoir bien voulu s'intéresser à mon travail en acceptant de le juger.

Je remercie Monsieur S. MOREAU d'avoir assuré la direction scientifique de ce travail.

J'ai pu apprécier son enthousiasme et son dynamisme ainsi que son sens aigu de l'efficacité.

Qu'il trouve, ici, l'expression de ma profonde estime et de ma reconnaissance.

Je remercie Monsieur le Professeur D. CAMUS, pour la confiance qu'il m'a témoignée.

Je le prie d'accepter ma profonde reconnaissance pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail.

Enfin, je ne saurais commencer ce travail sans souligner la compétence et la gentillesse de tous ceux qui m'ont prodigué aide et conseils, et en particulier Monsieur G. PRENSIER et Monsieur C. SLOMIANNY.

Je remercie avec une mention spéciale Madame Annick MASSET pour l'aide efficace qu'elle m'a procurée tout au long de ce travail.

J'associe à ces remerciements Madame Michèle MASURELLE qui a réalisé, avec patience et compétence, la frappe et la mise en page de cette thèse.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	8
GENERALITES	10
I - HISTORIQUE	12
II - CYCLE BIOLOGIQUE DE <u>PLASMODIUM SP.</u>	14
1) Le cycle chez le vertébré	14
a) Cycle asexué	14
b) Début du cycle sexué : gamogonie	15
2) La sporogonie : fin du cycle sexué	16
III - RAPPELS DU MECANISME D'ENDOCYTOSE DE L'HEMOGLOBINE CHEZ PLASMODIUM	16
IV - CHIMIOThERAPIE	18
1) Les antimétabolites	20
2) Les amino-8-quinoléines	21
3) Les schizonticides sanguins	21
LES SCHIZONTICIDES SANGUINS	23
I - STRUCTURES CHIMIQUES	23
1) Molécules de type chloroquine	23
2) Molécules de type quinine	24
II - PROPRIETES BIOLOGIQUES	26
1) Relations structures-activité	26
a) Molécules de type chloroquine	26
b) Molécules de type quinine	28
2) Propriétés biologiques	30
a) Concentration dans les hématies parasitées	31
b) Coalescence du pigment malarique	33
III - MODE D'ACTION	34
1) Interaction ADN-chloroquine	35
2) Propriétés lysosomotropes de la chloroquine	37
3) Interaction chloroquine-hématine	41
IV - CONCLUSION	44
RESULTATS	45
SONDES MOLECULAIRES	46
I - CONCEPTION DES SONDAS	46
1) Structures antigéniques	46
2) Propriétés biologiques	48
3) Reticulation	48
4) Liaison avec les macromolécules et obtention des anticorps	50
II - SYNTHESAS CHIMIQUES	50
1) Synthèse de CQA (chloro-7 (amino-4-butylamino)-4 quinoléine)	50
2) Synthèse de la sonde DAMP (N(dinitroanilo-2,4)-3 Amino-3'méthylidipropylamine)	51
3) Dérivé succinylé	52
III - PREPARATION DES CONJUGUES ANTIGENIQUES	52
1) CQA-MSA	52
2) DNB-RSA	53
IV - PRODUCTION D'ANTICORPS	53
1) Anticorps monoclonaux	53
2) Anticorps polyclonaux antidinitrobenzène	53
V - SPECIFICITE DE L'ANTICORPS MONOCLONAL ANTI-CHLOROQUINOLEINE	55

IMMUNODETECTION	56
I - EVOLUTION DES SOUCHES	56
1) <u>Plasmodium berghei</u> N	56
2) <u>Plasmodium berghei</u> RC	56
3) <u>Plasmodium yoelii nigeriensis</u>	57
II - LOCALISATION DES AMINO-4-QUINOLEINES	57
1) Tests biologiques	57
2) Immunolocalisation de la sonde CQA	58
a) <u>Plasmodium berghei</u> N	59
b) <u>Plasmodium berghei</u> RC	60
3) Discussion	61
III - LOCALISATION DE LA SONDE DAMP	64
1) <u>Plasmodium berghei</u> N	65
2) <u>Plasmodium berghei</u> RC	65
3) Discussion	66
DISCUSSION GENERALE	68
CONCLUSION	73
MATERIELS ET METHODES	77
I - SOURIS - SOUCHES - HEMATOLOGIE ET INFESTATION	78
1) Hôte expérimental : souris	78
2) Souches	78
a) Entretien des souches	78
b) Cryopréservation	78
3) Hématologie - Infestation	79
a) Frottis sanguins	79
b) Parasitémie	80
c) La réticulocytémie	80
d) Infestation	80
4) Activités biologiques	81
a) Test de 4 jours	81
b) Test de coalescence du pigment malarique	81
II - SYNTHÈSE DE LA SONDE CQA	81
III - SYNTHÈSE DE LA SONDE DAMP	83
IV - PRÉPARATION DES CONJUGUES HAPTÈNE-PROTEINE	84
1) CQA-MSA	84
a) Synthèse du dérivé succinylé de CQA	84
b) Greffage du dérivé succinylé de CQA sur la MSA	85
2) DNB-RSA	85
a) Préparation de la sérumalbumine de lapin (RSA)	85
b) Greffage du DNB sur la RSA en 50 % DMSO	86
V - PRODUCTION D'ANTICORPS POLYCLONAUX	86
* E.L.I.S.A.	87
VI - MICROSCOPIE ELECTRONIQUE	88
1) Préparation de l'échantillon sanguin	88
2) Coupes ultrafines	88
3) Immunomarquage	88
* Préparation de la méthylcellulose	90
BIBLIOGRAPHIE	91
PLANCHES	104

INTRODUCTION

Le paludisme demeure à l'heure actuelle un fléau mondial. En effet, de toutes les affections parasitaires chez l'homme, le paludisme est celle qui frappe le plus d'individus et qui est responsable de la plus forte mortalité. Dans le traitement de cette parasitose, la voie de la chimiothérapie est actuellement la plus utilisée.

L'apparition de souches résistantes aux médicaments, l'extension de ce phénomène au continent africain, en particulier, sont parmi les raisons majeures de la recrudescence de la maladie ces dernières années.

Le mode d'action de la chloroquine (amino-4-quinoléïne), principal médicament antipaludique, reste largement méconnu. Quant aux mécanismes présidant aux phénomènes de résistance, ils sont totalement ignorés.

Depuis quelques années, le laboratoire s'est intéressé au mode d'action de la série majeure des antimalariques : les schizonticides sanguins (chloroquine, quinine...).

Ce travail se situe dans cette préoccupation. Il tente d'apporter une réponse à un aspect du mode d'action de ces molécules : le mécanisme moléculaire responsable de leurs concentrations intraparasitaires .

Le but de ce travail est de localiser, avec précision, les sites de rétention des amino-4-quinoléïnes chez des souches de Plasmodium berghei chloroquino sensible et résistante.

Conjointement à cette étude, nous avons recherché et déterminé les compartiments acides chez ces mêmes souches de Plasmodium.

Avant d'exposer nos travaux, nous présenterons un rappel sur la biologie de Plasmodium et ferons le point sur les connaissances dans le domaine du mode d'action des schizonticides sanguins.

GENERALITES

Le parasitisme est, tant chez les animaux que chez les végétaux, un mode de vie très répandu. Il n'est guère de grand groupe de formes vivantes qui ne renferme des espèces ayant opté pour cette solution qui assure parfois le "gîte" et toujours le "couvert". Tout parasite présente en général au cours de son cycle évolutif une forme de dissémination sinon une reproduction sexuée qui assure son maintien et sa prolifération chez l'hôte.

Aussi, au sein des sporozoaires, certains s'enkystent (exemple de la majorité des Grégarines) tandis que d'autres subissent des multiplications asexuées ou schizogoniques. C'est le cas des Coccidies et parmi elles des Hémosporidies. Ce groupe de parasites hétéroxènes se multiplie dans les hématies de divers vertébrés (Reptiles, Oiseaux et Mammifères). L'agent du paludisme (Hémosporidie plasmodiidés) est connu par son action pathogène souvent mortelle, chez l'homme. Sa prolifération dans le sang revêt un caractère rythmique se traduisant par une hémolyse périodique et la libération des formes infectieuses, accompagnée de celle de substances toxiques responsables des poussées de fièvre caractérisant l'accès palustre.

Les quatre espèces reconnues spécifiques à l'homme sont :

- **Plasmodium falciparum**
- **Plasmodium malariae**
- **Plasmodium vivax**
- **Plasmodium ovale**

Seul le Plasmodium falciparum détermine des formes encéphaliques et est responsable de l'immense majorité des cas mortels de paludisme.

Dans la majeure partie de la région afrotropicale le paludisme à P.falciparum sévit avec une très haute endémicité et touche 291 millions de personnes (39).

I - HISTORIQUE

La maladie actuellement dénommée paludisme est connue depuis l'antiquité et les Egyptiens savaient déjà, à cette époque, que la fièvre qui la caractérise survenait après les inondations et les pluies.

En 1630, en Equateur, un aristocrate espagnol fut guéri par l'absorption d'une décoction d'écorce de Quinquina, drogue connue depuis longtemps par les Péruviens.

Ce n'est que deux siècles plus tard, le 6 Novembre 1880, que Laveran découvre l'agent responsable du paludisme à l'hôpital militaire de Constantine.

Le nom de genre Plasmodium lui fut attribué par Marchiafava et Celli en 1885, à la suite de leur étude morphologique de la schizogonie érythrocytaire.

Bien que l'association paludisme-marécage soit bien connue, ce n'est qu'en 1883 que King émet l'hypothèse qu'il existe un rapport entre moustiques et paludisme.

Quatorze ans plus tard, en 1897, le cycle sporogonique des Plasmodium d'oiseaux est décrit chez Culex fatigans par Ross.

Le cycle sporogonique soupçonné par Ross est définitivement établi par Grassi-Bastianelli et Bignami en 1898 quand ils montrent la transmission du paludisme à l'homme par les Anophèles.

Le cycle complet du développement des Plasmodium reste cependant méconnu jusqu'en 1948, année où Shortt et Garnham démontrent l'existence d'un cycle schizogonique hépatique, chez P.cynomolgi (singe rhésus) et P.vivax (homme).

Dans la même année, Vincke et Lips observent le premier Plasmodium de rongeurs qui s'est avéré par la suite un matériel modèle pour les études biologiques du paludisme des mammifères.

MOUSTIQUE

RONGEUR

Glandes salivaires

Cellules hépatiques

Sporozoites

PHASE

EXOERYTHROCYTAIRE

Epithélium intestinal

Hématie

Anneau

Trophozoite

PIQUIRE

PHASE

INTRAERYTHROCYTAIRE

Dokinète

Zygote

Macrogamète

Microgamète

Exflagellation

Macrogamétocyte

Microgamétocyte

Mérozoites

Invasion

Hémolyse

Schizonte

Préschizonte

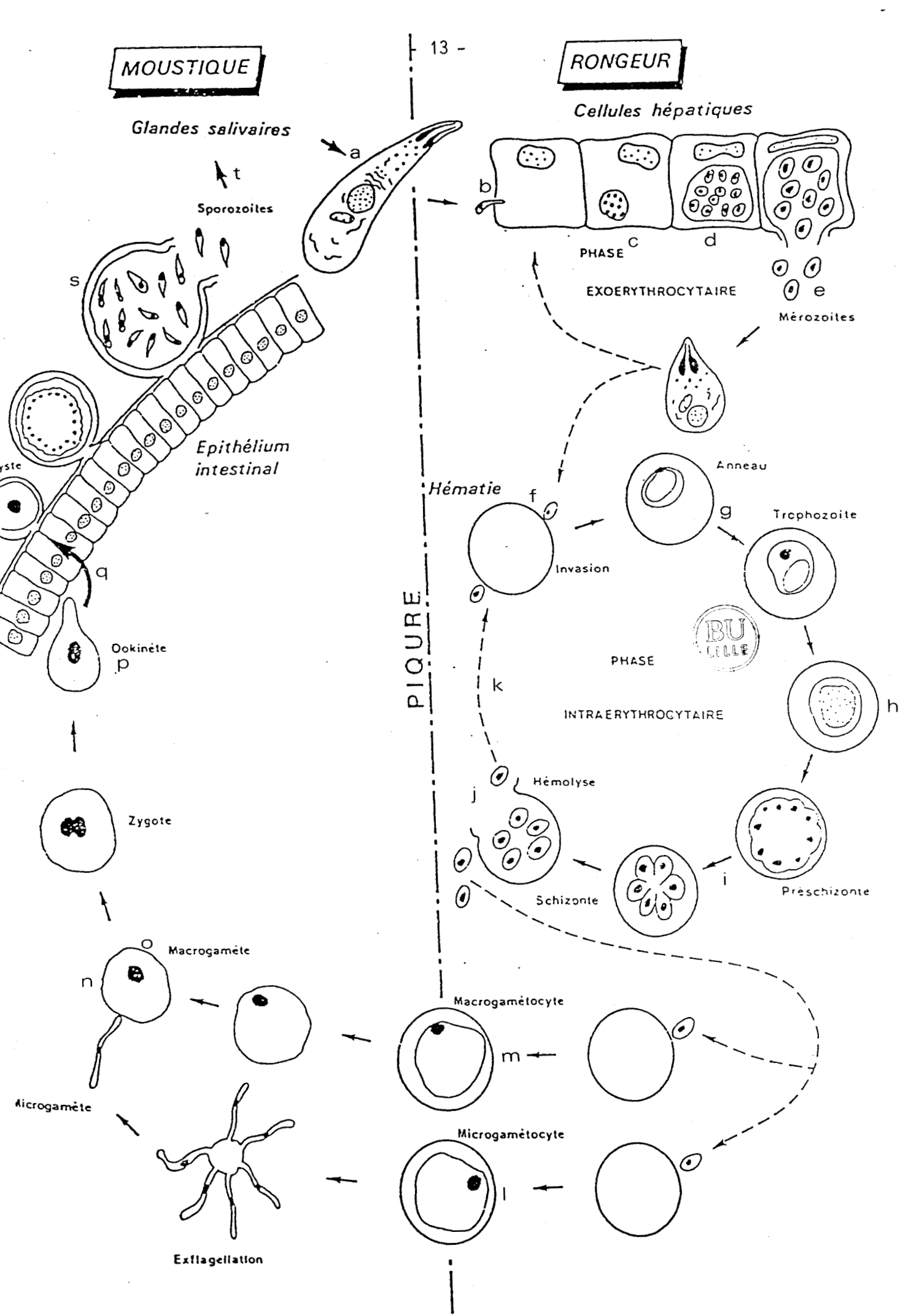


Figure A : Cycle évolutif de *Plasmodium murin*.

II - CYCLE BIOLOGIQUE DE PLASMODIUM SP. (Fig. A.)

La transmission naturelle du paludisme s'effectue par l'intermédiaire des piqûres d'Anophèles femelles, bien qu'il existe d'autres possibilités de transmissions accidentelles par voie transfusionnelle ou par voie transplacentaire.

Le cycle évolutif de Plasmodium sp. se partage entre deux hôtes :

- l'hôte intermédiaire, un vertébré (Reptiles, oiseaux ou mammifères) abrite la phase de reproduction asexuée (schizogonie) et l'amorce de la phase sexuée (gamogonie).
- l'hôte définitif, un moustique (Anophèle femelle) assure la phase de reproduction sexuée (sporogonie) = vecteur.

1) Le cycle chez le vertébré

a) Cycle asexué

* schizogonie hépatique ou exo-érythrocytaire

Le sporozoïte (a), forme infestante du Plasmodium, est transmis par l'Anophèle femelle qui, pendant sa piqûre, inocule avec sa salive plusieurs centaines, voire plusieurs milliers, de sporozoïtes.

Le sporozoïte inoculé a un tropisme pour le foie (b) : il reste au maximum une heure dans le sang puis pénètre dans un hépatocyte où s'effectue la schizogonie exoérythrocytaire.

Le sporozoïte ayant pénétré dans l'hépatocyte prend le nom d'hépatozoïte ou cryptozoïte.

Pendant que l'hépatozoïte grossit son noyau se divise (c), il devient un schizonte mûr géant de 50 à 100 μm , encore appelé corps bleu. Le schizonte refoule vers la périphérie le noyau de la cellule hôte.

Chaque noyau-fils s'entoure de cytoplasme et devient ainsi un mérozoïte (d). A maturité, l'hépatocyte se lyse et libère les mérozoïtes (e).

Selon l'espèce, les mérozoïtes peuvent redémarrer le cycle hépatique, comme ils peuvent passer dans le sang où le cycle intraérythrocytaire débute par l'invasion des hématies (8).

* Schizogonie érythrocytaire

Le mérozoïte dans l'hématie (f) se développe en un trophozoïte caractérisé par l'ingestion puis la dégradation de l'hémoglobine. Après un passage par un stage jeune ou "en anneau" (g), il devient un trophozoïte mûr (h). Ce stade est caractérisé par l'abondance du pigment typique chez Plasmodium, l'hémozoïne qui est le produit de dégradation du cytoplasme érythrocytaire.

Le trophozoïte âgé prend une forme plus ou moins sphérique tandis que le matériel nucléaire augmente de volume et subit plusieurs divisions : c'est le stade préschizonte (i). Quand le préschizonte atteint son développement complet, chaque noyau s'entoure de cytoplasme (i) tandis qu'apparaissent les organites apicaux de futurs mérozoïtes qui vont se disposer de façon centrifuge. Il se forme un "corps en rosace" ou schizonte.

L'hématie parasitée se lyse et libère les mérozoïtes (j) : c'est à ce moment que se déclenche l'accès palustre.

Chaque mérozoïte pénètre dans une nouvelle hématie et le cycle recommence (k).

La durée du cycle érythrocytaire est fonction de l'espèce.

b) Début du cycle sexué : gamogonie

Certains mérozoïtes, après pénétration dans la cellule érythrocytaire se différencient en gamétocytes mâles et femelles précurseurs de gamètes.

La présence de gamétocytes (l et m) dans le sang d'un sujet fait de lui un "réservoir de virus". Cette présence ne détermine aucune manifestation clinique.

2) La sporogonie : fin du cycle sexué

En cas de piqûre d'un "réservoir de virus", l'Anophèle femelle aspire un mélange d'hématies saines et d'hématies parasitées avec prédominance de gamétocytes qui se rassemblent préférentiellement dans les capillaires périphériques.

Dans l'estomac, les microgamétocytes subissent l'exflagellation et donnent les gamètes mâles (n) alors que les macrogamètes évoluent en gamètes femelles (o). L'oeuf mobile ou ookinète (p) résultant de la fécondation est le stade diploïde du cycle.

L'ookinète migre à travers l'épithélium intestinal (q) et s'enkyste sous la lame basale et devient un oocyste (r).

A l'intérieur de l'oocyste, des divisions actives du noyau aboutissent à la différenciation des sporozoïtes. A la fin de la sporogénèse, l'oocyste se lyse et libère les sporozoïtes (s) qui vont s'accumuler dans les glandes salivaires du moustique, en attente d'être inoculés lors d'une piqûre.

III - RAPPELS DU MECANISME D'ENDOCYTOSE DE L'HEMOGLOBINE CHEZ PLASMODIUM

La synthèse de l'ensemble des travaux de morphologie ultrastrurale conduit à considérer qu'il existe chez Plasmodium deux systèmes d'endocytose (Fig. B).

- Sur le pourtour des grandes invaginations (IV) ainsi que sur la périphérie du parasite, Slomianny et Prensier notent l'existence de petites vésicules suggérant la présence d'un phénomène de micropinocytose.

- Un système cytotosomal composé d'un cytotome (Cs) typique d'où bourgeonne une vacuole cytotomale (VC) s'allongeant en un tube profond qui peut d'ailleurs se ramifier (tube cytotomal TC). De l'extrémité distale de ce tube, se détachent des vacuoles (54).

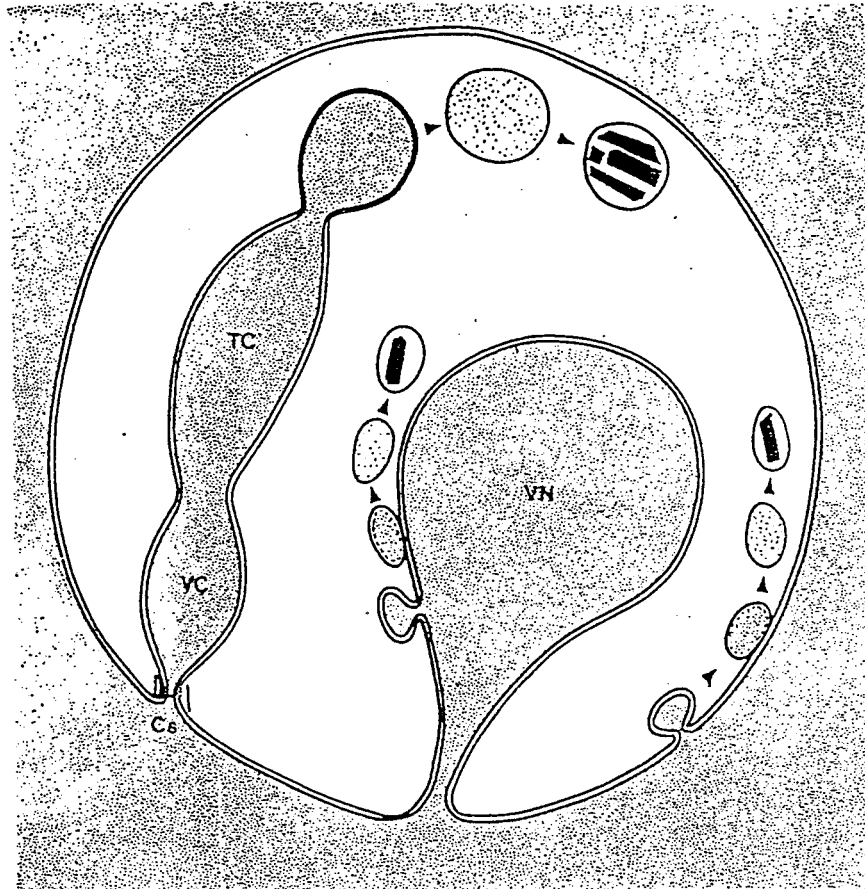


Fig. B. Schéma des processus d'endocytose chez P. chabaudi

La membrane interne de ces vacuoles et vésicules disparaît. A ce moment seulement leur contenu s'altère pour donner en phase finale un composé cristallin, le pigment palustre, partie non dégradée de l'hémoglobine.

Les structures internes du parasite ne sont pas figées ; elles évoluent en permanence. Il est connu que les vacuoles et les vésicules pigmentaires fusionnent plus ou moins rapidement selon l'espèce pour former une vacuole résiduelle qui sera libérée en fin de schizogonie.

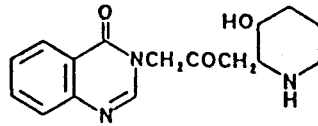
IV - CHIMIOTHERAPIE

La chimiothérapie est définie, entre autres, comme l'administration d'une substance qui possède une action antimicrobienne systémique. Depuis très longtemps, l'homme a cherché dans les produits de la nature un remède au paludisme. Un des plus anciens est le ch'ang shan fabriqué en Chine à partir d'une poudre de racine de Dichroa fébrifuga. Des recherches récentes ont montré que le principe actif de cette plante est la fébrifugine.

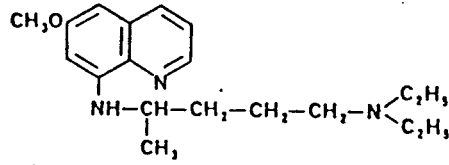
Le second médicament actif végétal largement utilisé est la quinine contenue dans l'écorce de Quinquina.

Depuis, bien d'autres antipaludiques ont été mis au point et commercialisés ; il s'agit de produits de synthèse : la plasmoquine ou pamaquine, la quinacrine ou mépacrine, la chloroquine ou résoquine, la primaquine, le chlorguanide ou proguanil et la pyriméthamine.

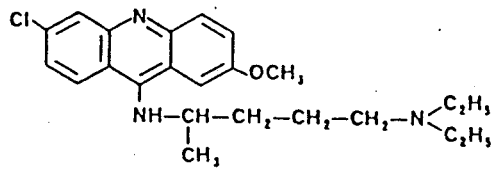
Puis, pendant les années 1950, il y eut un déclin dans la recherche de nouveaux antimalariques. Beaucoup de chercheurs considéraient alors que le problème du traitement du paludisme était résolu. C'est alors qu'un inquiétant phénomène de résistance fit son apparition, tout d'abord vis-à-vis du chlorguanide et de la pyriméthamine.



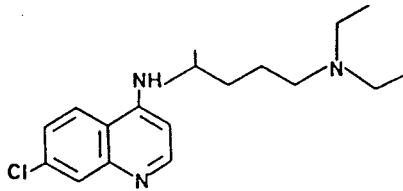
FEBRIFUGINE



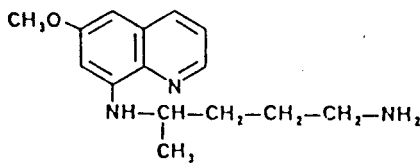
PAMAQUINE



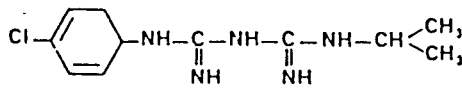
MEPACRINE



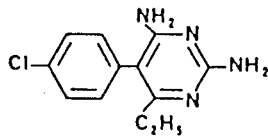
CHLOROQUINE



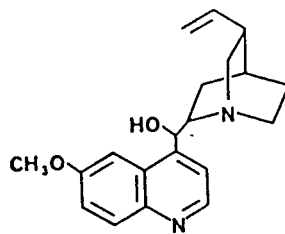
PRIMAQUINE



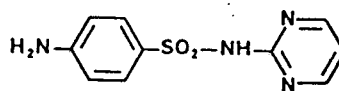
CHLORGUANIDE



PYRIMETHAMINE



QUININE



SULFADIAZINE

La résistance à un médicament est définie comme "la possibilité pour une souche de parasites de survivre ou de se multiplier dans l'organisme d'un malade, en dépit de l'administration et de la résorption d'un médicament à des doses égales ou supérieures à celles habituellement recommandées, sans toutefois dépasser les limites de tolérance du sujet". (O.M.S. 1973).

Plus récemment, la résistance de P.falciparum à la chloroquine et aux autres antipaludiques de synthèse commença à se manifester. La quinine reste le traitement le plus sûr dans le cas du paludisme.

L'apparition de ces phénomènes de résistance rendait plus que jamais nécessaire la poursuite des recherches.

Actuellement, les thérapeutes ont à leur disposition trois grandes classes de médicaments définies à partir des critères suivants :

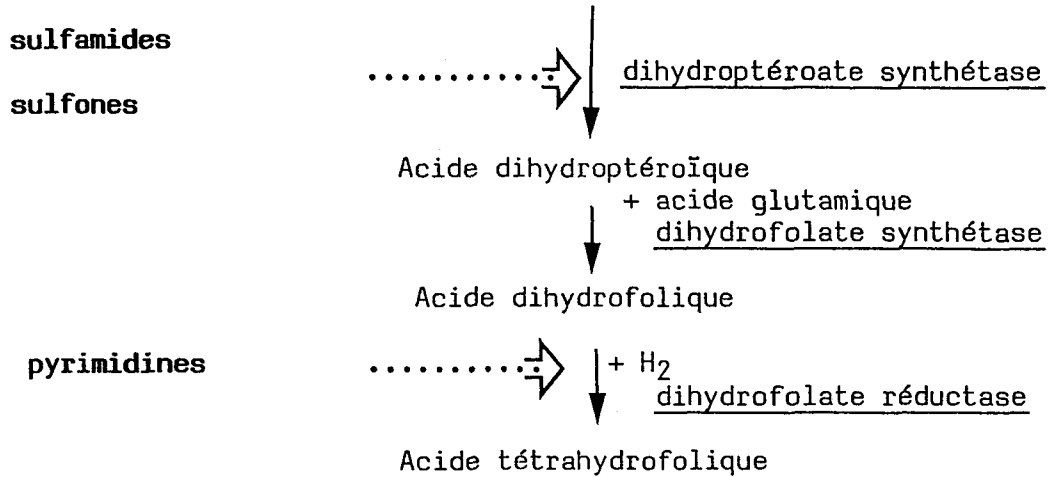
- le niveau du cycle parasitaire où s'exerce leur action
- leur structure chimique
- et surtout leur mode d'action.

1) Les antimétabolites

Ils agissent lentement et sont actifs à presque tous les stades de développement du parasite. Seuls les gamétocytes matures ne sont pas touchés (34).

La voie de biosynthèse de l'acide tétrahydrofolique est présenté dans le schéma suivant :

Acide para-aminobenzoïque
+ dihydroptérine



Le niveau d'action, sur ce métabolisme, des sulfamides et pyrimidines est indiqué par les flèches.

Partout où la pyriméthamine a été employée à grande échelle des souches résistantes sont rapidement apparues.

2) Les amino-8-quinoléines

Elles agissent à tous les stades du cycle de développement du parasite. Par leur toxicité importante pour l'homme, elles ne sont utilisées que pour éliminer les formes persistantes pré-érythrocytaires de P.vivax et P.ovale (34).

3) Les schizonticides sanguins

Ils constituent la classe la plus utilisée de médicaments, tant en thérapie qu'en prophylaxie. Ils sont actifs uniquement sur les formes intraérythrocytaires du parasite.

Nous examinerons en détail, dans le chapitre suivant, le point des connaissances sur le mécanisme d'action de ces molécules, dont l'étude constitue l'objet de ce travail.

Nous exposerons brièvement ici, les aspects liés à l'apparition et au développement de la résistance à la chloroquine essentiellement.

L'apparition de souches de P.falciparum résistantes à la chloroquine a été reconnue dans les années 1959 et 1960 en Amérique latine, en Asie du Sud-est et dans le pacifique. Durant les années qui suivirent des cas de plus en plus sont apparus sur le continent indien et dans des zones importantes d'Afrique centrale et d'Afrique de l'Est (Fig. C) (39).



Seul P.falciparum présente une résistance à la chloroquine contrairement aux trois espèces parasites de l'homme (vivax, malariae et ovale) qui, elles, sont sensibles à la chloroquine.

LES SCHIZONTICIDES SANGUINS

Les schizonticides sanguins, catégorie de molécules antimalariques les plus utilisées en thérapeutique, sont en réalité très mal connus quant à leurs mécanismes d'action. Ils peuvent être classés sur la base de leurs structures chimiques et de leurs propriétés biologiques en deux catégories :

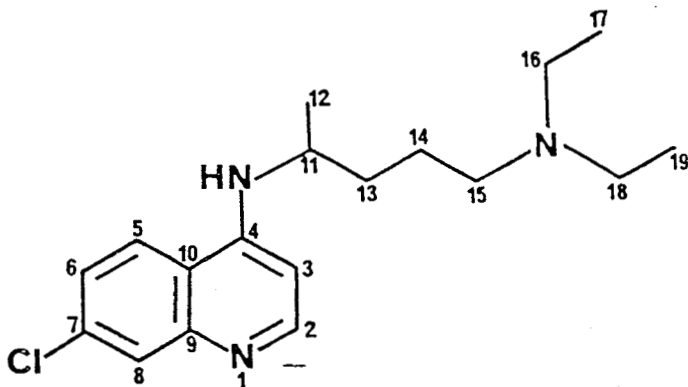
- les molécules de type chloroquine
- les molécules de type quinine

Nous allons examiner en détail ces divers aspects.

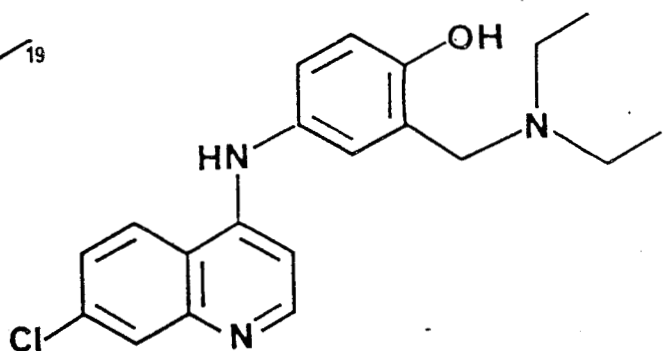
I - STRUCTURES CHIMIQUES

1°) Molécules de type chloroquine

La chloroquine, l'amodiaquine sont des amino-4-quinoléines, caractérisées par la présence d'un noyau quinoléïque et d'une chaîne latérale comportant un azote basique :



CHLOROQUINE



AMODIAQUINE.



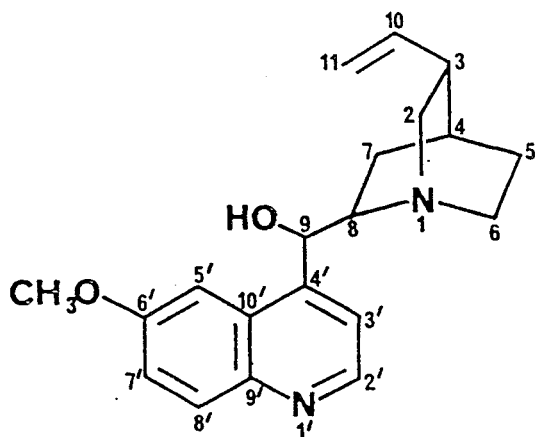
La chloroquine présente deux azotes basiques (33) :

- l'azote du groupement diéthylamine $pK_a = 10,16$
- L'azote du noyau quinoléique $pK_a = 8,06$

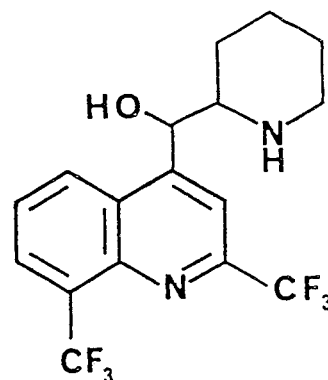
2) Molécules de type quinine

Les molécules de ce groupe sont caractérisées par un noyau aromatique (quinoléine ou phénanthréne), une fonction alcool et un azote à caractère basique.

Nous retiendrons essentiellement deux molécules : la quinine et la méfloquine.

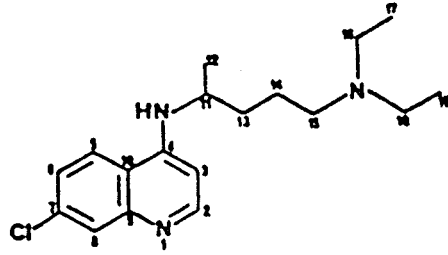


QUININE

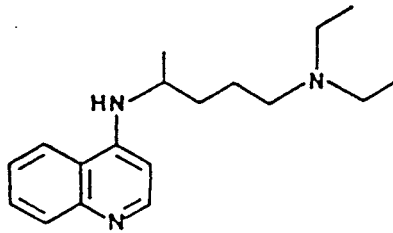


MEFLOQUINE

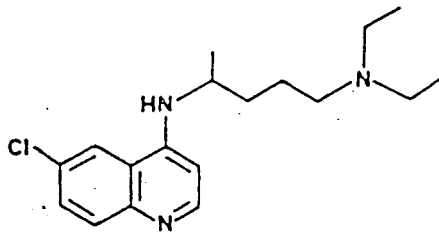
La quinine possède un azote basique de $pK_a = 8,4$ et présente une configuration R en C9.



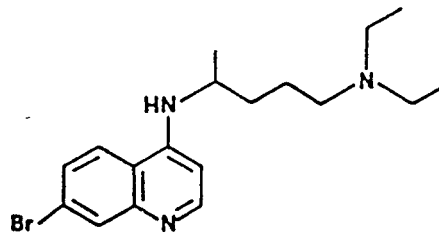
CHLOROQUINE



SN 6732



WR 8671



SN 7373

II - PROPRIETES BIOLOGIQUES

Nous examinerons en premier les relations entre structures et activités biologiques de ces deux séries de médicaments ; puis les effets biologiques connus de ces mêmes molécules.

1) Relations structure-activité

Elles sont issues de très nombreuses molécules synthétisées autour de ces deux têtes de files que sont la chloroquine et la quinine.

a) Molécules de type chloroquine

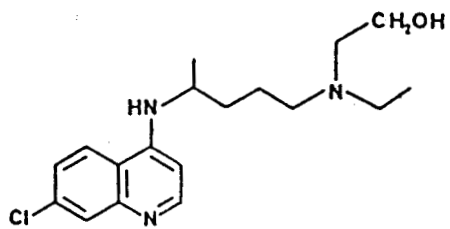
. Modifications du noyau quinoléïque

La suppression de l'atome de chlore en position 7 aboutit à une molécule (SN6732) dont l'activité a chuté de 93 % (6).

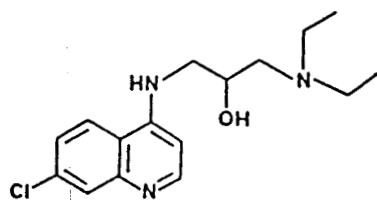
Lorsque cet atome est déplacé en position 6 (WR8671), l'activité antimalarique n'est pas altérée. Par contre, le déplacement de l'atome de chlore de la position 7 à la position 5 ou 8 provoque une diminution de 97% de l'activité de la chloroquine (6).

Les molécules voient leur activité in vitro diminuée de moitié si ce même atome de chlore est substitué par un halogène plus volumineux (brome : SN7373), par un atome moins lipophile (fluor) ou par un groupement trifluorométhyle (SN11524) (6).

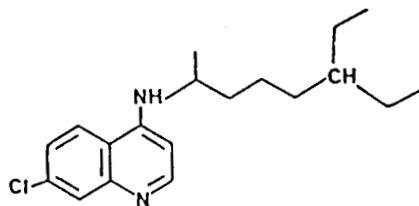
La présence d'un groupement méthyle en position 3 du noyau quinoléïque diminue l'activité tant in vitro qu'in vivo ; la molécule ainsi formée est la sontoquine (6).



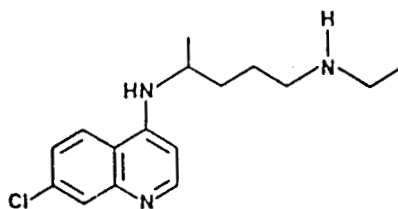
HYDROXYCHLOROQUINE



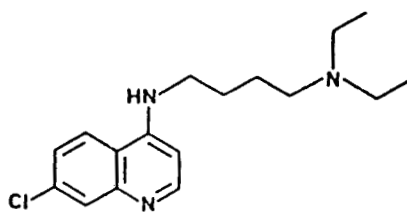
OXYCHLOROQUINE (WR 4206)



WR 93156



WR 29623



SN 8136

L'efficacité de la chloroquine chute de 90 % lorsque l'hydrogène en position 2 du noyau quinoléique est substitué par un groupement méthyle (6).

Ces expériences montrent que l'atome de chlore ainsi que l'environnement de l'azote aromatique jouent un rôle important dans l'activité antimalarique de la chloroquine.

. Modifications de la chaîne latérale

Les amino-4-quinoléïnes possédant une fonction hydroxyle sur la chaîne latérale conservent l'activité antimalarique (Hydroxychloroquine, oxychloroquine).

L'azote terminal est indispensable : son remplacement par un atome de carbone (WR93156) se traduit par la chute de l'activité de la chloroquine in vitro et in vivo (59).

La substitution d'un groupement éthyle fixé sur l'azote terminal par un atome d'hydrogène conduit à une molécule (WR29623) ne possédant plus que 50 % de l'activité antimalarique de la chloroquine (6).

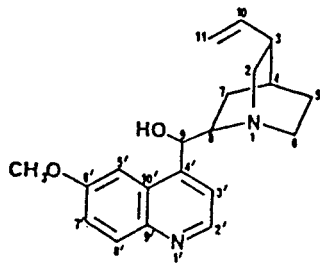
Par contre, la suppression du groupement méthyle (SN8136) n'altère pas l'activité de la chloroquine (6).

Burckhalter et al. (1948-1949) ont introduit dans les amino-4-quinoléïnes, la structure -dialkylamino-o-crésol, à activité antimalarique connue, ce qui aboutit à la formation de molécules utilisées en thérapeutique telles que l'amodiaquine, l'amopyroquine et la cycloquine.

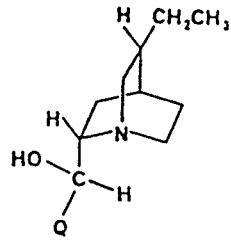
b) Molécules de type quinine

. Modifications du noyau quinoléique

La présence d'un substituant volumineux près de l'azote aromatique semble de peu d'importance contrairement à ce l'on observe chez les médicaments de type chloroquine.

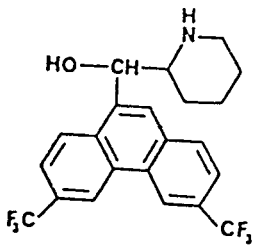


QUININE

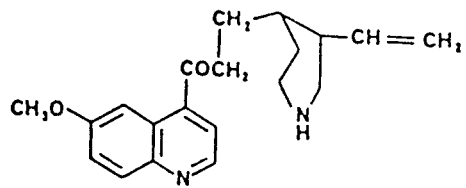


Q = 4-methoxy-4-quinolyl

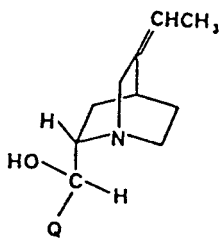
EPIHYDROQUININE



WR 122455

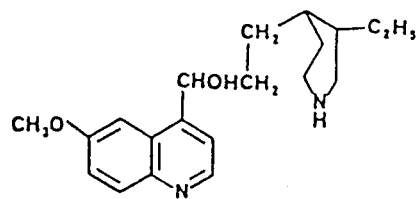


QUINICINE



Q = 4-methoxy-4-quinolyl

ISOQUININE



DIHYDROQUINICINOL

Il semble même pouvoir être supprimé. Ainsi, en l'absence de l'azote quinoléique, la molécule synthétique WR122455 est un bon antimalarique (59).

. Modifications de la chaîne latérale

L'activité antimalarique est étroitement liée à la stéréochimie de l'atome de carbone en position 9 dont la configuration doit être R. L'épimère en 9 (épiquinine) est inactif. De plus, la suppression ou le remplacement par un halogène, une cétone, de la fonction hydroxyle en position 9 affectent considérablement l'activité antimalarique (46).

Les mêmes résultats sont obtenus en supprimant ou en remplaçant la fonction vinyle en position par une fonction alcool (quininol) ou par une fonction acide carboxylique (quinétidine) (46). Par contre la perte de l'asymétrie du carbone en position 3 (isoquinine) ainsi que l'inversion de configuration de direction de ce groupement vinyle réduit (épihydroquinine) n'ont que peu d'effet sur l'activité antimalarique de la quinine (46).

La rupture de la liaison entre le carbone en position 8 et l'azote en position 1 donnent des composés inactifs tels que les quinicines et les dihydroquinicinols (46).

2) Propriétés biologiques

Lorsque les érythrocytes infestés avec P.berghei sont soumis à l'action de la chloroquine, on observe deux phénomènes :

- une accumulation rapide du médicament dans les cellules infestées ;
- une coalescence du pigment malarique.

a) Concentration dans les hématies parasitées

La concentration préférentielle des schizonticides sanguins dans les hématies parasitées au dépend des cellules de l'hôte (globule rouge ou autres cellules) est un phénomène essentiel dans la compréhension du mode d'action de ces molécules.

L'aptitude de molécules telles que la quinine à se concentrer dans les érythrocytes parasités fut démontré dès 1938 par Bock. Fitch en 1969 analysa plus finement le phénomène de concentration de la chloroquine dans les hématies parasitées par P.berghei démontré par Macomber et Coll. (38).

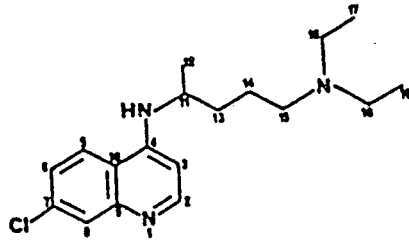
Lorsque les hématies parasitées et non parasitées sont mises en présence de la chloroquine ($10^{-8}M$), le rapport de concentration en chloroquine (cellule/milieu de culture) est le suivant :

- 600/1 pour les hématies parasitées par une souche sensible,
- 100/1 pour les hématies parasitées par une souche résistante,
- 14/1 pour les hématies non parasitées.

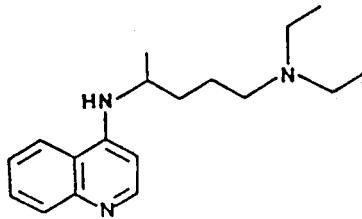
Cependant, ce phénomène est sensible aux conditions de pH du milieu d'incubation : une élévation du pH augmente la quantité de chloroquine accumulée dans la cellule parasitée.

Ce phénomène dépend également des fonctions énergétiques de la cellule parasitée (23) : il est stimulé par la présence de pyruvate, lactate, glucose ou glycérol. Le glucose stimule la concentration de la chloroquine chez P.falciparum sensible par contre une souche résistante ne présente pas cet effet de stimulation par le glucose (23).

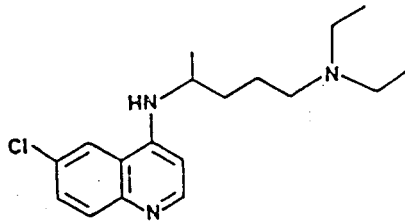
Des drogues de la même classe thérapeutique (schizonticides sanguins) telles que la quinine, l'amodiaquine, la méfloquine inhibent la concentration de la chloroquine dans les hématies parasitées (21).



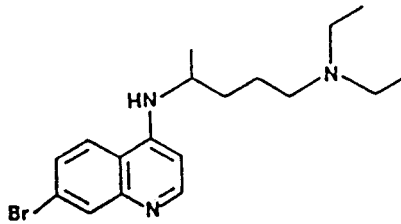
CHLOROQUINE



SN 6732



WR 8671



SN 7373

Fitch et coll. (23) montrent également que certaines modifications structurales de la chloroquine conduisent à des molécules provoquant une inhibition compétitive de l'accumulation de la chloroquine dans les hématies parasitées. Par la mesure des constantes d'inhibition (K_i), ces auteurs ont fait les constatations suivantes :

- Les molécules où l'atome de chlore en position 7 est remplacé par un atome de brome ($K_i = 5.10^{-7}M$), d'iode ($K_i = 4.10^{-7}M$) ou par un groupement trifluorométhyle ($K_i = 3.10^{-7}M$) ou par un hydrogène ($K_i = 5.10^{-7}M$) provoquent une forte inhibition compétitive de l'accumulation de la chloroquine.

- Deux composés où le noyau quinoléique est substitué en position 6 par un chlore (WR 8671, $K_i = 7.10^{-7}M$) ou par un méthoxy (SN3294, $K_i = 5.10^{-7}M$) donnent également les mêmes résultats.

- On observe également une forte inhibition compétitive pour les molécules dont la longueur de la chaîne aliphatique varie de 2 à 5 carbones, ou dont les groupements éthyloxy sont supprimés.

Les relations entre structures et inhibition compétitive de la concentration intraparasitaire de la chloroquine semblent donc moins restrictives que les relations structure-activité de la série chloroquine. En effet, le simple dérivé (SN6732) ne présentant pas l'atome de chlore en position 7 (et donc inactif) est capable d'inhiber la concentration de la chloroquine avec une constante d'inhibition identique à celle observée pour la chloroquine ($k_i = 5.10^{-7}M$) (23).

b - Coalescence du pigment malarique

Le pigment malarique, résidu de dégradation de l'hémoglobine, se présente sous forme de cristaux lors de l'observation au microscope électronique. Sa nature, sa composition chimique font toujours l'objet d'études.

Le pigment malarique est très couramment désigné sous le nom d'hémozoïne. Sa structure probable est une association entre la ferriprotoporphyrine IX (fer au degré d'oxydation + 3 complexé à la porphyrine) et des protéines.

Trente à trente cinq minutes après administration de la chloroquine à des souris infestées par P.berghei, les grains de pigments dispersés commencent à fusionner et en soixante à quatre-vingt minutes se rassemblent en un ou deux gros amas (60). Ce phénomène est désigné par le terme coalescence du pigment (ou "pigment clumping", en anglais).

Cette coalescence du pigment malarique est produite par des médicaments dérivés de la chloroquine (amodiaquine, mépacrine) et elle est inhibée par des molécules du type de la quinine (61).

Les médicaments du type quinine ne produisent pas la coalescence du pigment malarique mais plutôt sa dispersion (15).

Pour ce phénomène, il est également possible de définir une constante de dissociation ($K_d 2.10^{-8}M$) pour la chloroquine (61), ainsi que des relations entre les structures chimiques et leur activité (58) : la présence de l'atome de chlore en position 7, de même que celle de l'azote terminal sont indispensables à l'obtention de la coalescence du pigment, comme ils le sont pour exprimer l'activité antimalarique.

Cette activité est utilisée comme test de l'activité des molécules antimalariques.

III - MODE D'ACTION

A partir de ces deux propriétés biologiques : concentration intraparasitaire et coalescence du pigment malarique, les auteurs ont proposé l'intervention de récepteurs biologiques pour les schizonticides sanguins.

Les mesures de concentration à l'équilibre entre chloroquine intraparasitaire et chloroquine externe permettent d'atteindre une valeur de constante d'affinité (k_a) de la chloroquine pour l'hématie parasitée de $10^8 M^{-1}$.

La recherche du ou des récepteurs supposés a fait l'objet de nombreux travaux. Nous retiendrons trois pistes de travail qui ont été développées pour expliquer les propriétés antimalariques de ces médicaments :

1. Interaction avec l'ADN parasitaire
2. Concentration dans des lysosomes
3. Interaction avec la ferriprotoporphyrine IX

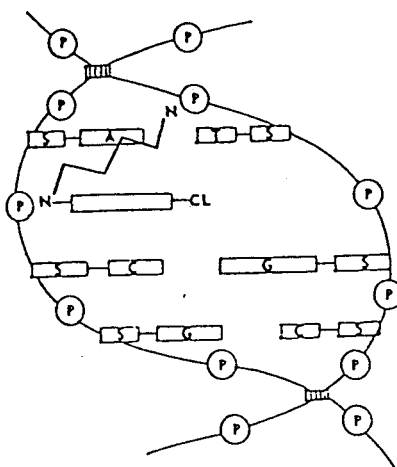
Nous allons examiner en détail ces trois approches.

1) Interaction ADN-chloroquine

Parker et Irvin, en 1949 et en 1952 (43), ont montré par des mesures de dialyse et de viscosité mais surtout par des études spectroscopiques que la chloroquine forme un complexe avec l'ADN (le spectre U.V. de la chloroquine est altéré en présence de l'ADN).

En 1965, Cohen et al. (12) observent les interactions entre la chloroquine et l'ADN par spectroscopie et ils en concluent qu'il existe deux sites pour la formation du complexe, l'un ayant une constante d'association K_a de 10^4 l.mole^{-1} et l'autre de 10^3 l.mole^{-1} .

En 1965, O'Brien et Hahn (42) proposent un modèle tenant compte de l'activité antimalarique de la chloroquine et de ses dérivés. En particulier, ils suggèrent que :



- les molécules exercent leur activité antimalarique en s'intercalant avec l'ADN parasite. L'activité d'une molécule dépend de la stabilité du complexe formé avec l'ADN.

- un groupement électronégatif en position 7 du noyau quinoléïque est indispensable à l'activité.

- les fonctions amines de la chaîne latérale interagissent par liaison ionique avec les groupements phosphates des deux brins de l'ADN.

A ce stade, il est donc prouvé que la chloroquine se lie aux acides nucléiques. Cependant, la structure du complexe formé n'est pas clairement définie aussi en 1975, Bolte (9) a réalisé des travaux dans lesquels seule l'affinité de la quinoléïne pour la base est étudiée.

L'interaction par recouvrement des systèmes base et quinoléïne provoque en U.V. un effet hypochrome. Cet effet est directement lié à l'affinité des deux chromophores.

Les conclusions sont les suivantes :

- La chloroquine s'associe par empilement aux trois bases : adénine, guanine et thymine.

- L'ordre d'affinité croissante de la quinoléine chlorée pour les bases est : thymine << adénine = guanine.

L'affinité de la chloroquinoléine pour les bases des acides nucléiques étant établie, la nature des forces responsables est définie par Bolte en 1975 : ce sont des forces de Van der Waals du type forces de dispersion, qui s'expriment préférentiellement en phase aqueuse.

Néanmoins, l'interaction chloroquine-ADN comme mécanisme de concentration et d'action des schizonticides, est actuellement écartée. Trois éléments sont à retenir dans cette analyse :

- La constante d'affinité observée entre chloroquine et ADN ($K_a=10^4M^{-1}$) (31) est trop faible pour rendre compte de l'affinité de cette molécule pour le parasite ($K_a=10^8M^{-1}$).

- La chloroquine se lie tout autant au DNA de mammifère qu'au DNA plasmodial (30).

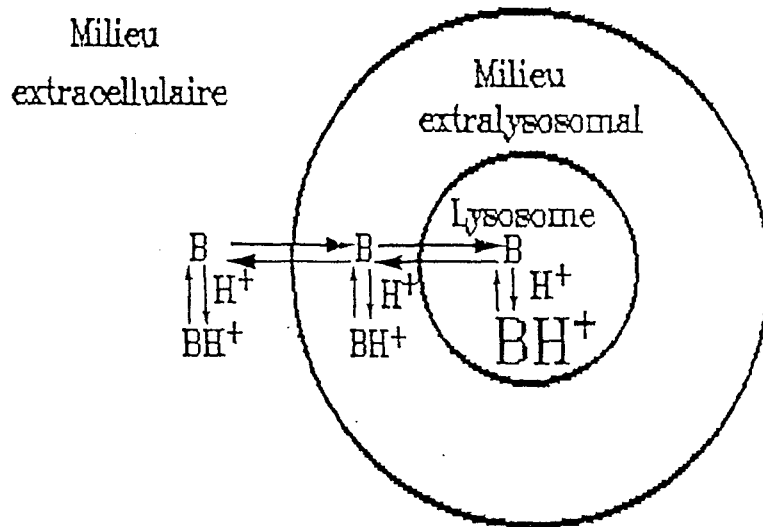
On ne peut donc expliquer par ce mécanisme la remarquable sélectivité de la chloroquine pour le globule rouge parasité au dépend des cellules de l'hôte.

- La méfloquine, antimalarique efficace, se concentrant de manière importante dans le parasite est capable d'inhiber compétitivement la concentration de la chloroquine mais n'intéragit pas in vitro avec le DNA (44).

2) Propriétés lysosomotropes de la chloroquine

Il est bien connu que la chloroquine est une drogue lysosomotrope (16). En effet, la chloroquine qui est une base faible peut se concentrer dans les compartiments acides.

Le mécanisme de concentration lysosomiale suppose bien évidemment l'existence d'un gradient de pH entre un compartiment acide (le lysosome) et le milieu extérieur de pH plus élevé. Ce mécanisme implique que seules les formes neutres (non protonées) traversent librement les membranes ; leurs concentrations sont équivalentes dans les différents compartiments cellulaires. Par contre, les formes chargées (protonées) des bases faibles (chlorure d'ammonium (NH_4Cl), méthylamine (CH_3NH_2), chloroquine,...) ne franchissent pas facilement les barrières membranaires d'où leur concentration dans les lysosomes (16).



Les molécules du type chloroquine possèdent deux fonctions basiques au pH physiologique ($\text{pH} = 7,4$), elles sont majoritairement sous forme diprotonées. Les deux fonctions amine de la chloroquine possèdent des pK_a respectifs de 8,06 et 10,16 (33).

Au pH physiologique, les proportions des différentes formes de chloroquine sont les suivantes : 86 % des molécules sont sous forme diprotonée, 14 % sous forme monoprotionée (seul l'azote terminal de la chaîne latérale est protonée) et seulement 0,2 % de forme neutre (non protonée) (24).

Lors de sa protonation dans le lysosome, la chloroquine consomme des protons fait remonter ainsi le pH intralysosomal.

En perturbant ce pH, la chloroquine affecte sérieusement certaines activités enzymatiques lysosomiales (16).

L'action de ce médicament sur les lysosomes permet son utilisation thérapeutique lors des traitements anti-inflammatoires. Elles expliquent en partie, les effets secondaires sur la rétine (7).

Dès 1972, Homewood et al. (32) proposaient que l'activité antimalarique de la chloroquine s'exprime grâce à un mécanisme identique.

Leur hypothèse repose sur les trois postulats suivants :

- * Il existe un compartiment acide de type lysosome chez Plasmodium.
- * Ce compartiment est le siège de la dégradation de l'hémoglobine : il est constitué par les vacuoles digestives du parasite.
- * La chloroquine se concentre dans ces vacuoles et bloque la dégradation de l'hémoglobine par une remontée du pH vacuolaire ; la dégradation de l'hémoglobine étant essentielle au développement du parasite.

Cependant, on note une différence importante entre les activités antimalarique et anti-inflammatoire de la chloroquine. La concentration intralysosomiale de la chloroquine dans une cellule de mammifère est aisément réalisée en présence d'une concentration extracellulaire en chloroquine de 20 μM à 100 μM (13,29).

L'activité antimalarique s'exprime, elle, à des doses de 100 à 1000 fois plus faible (24) c'est-à-dire à des concentrations externes de l'ordre de 10^{-7} à 10^{-8}M (27).

De très nombreux travaux ont été consacrés à la recherche et à l'étude des compartiments acides de Plasmodium.

Il est indéniable, que diverses méthodes de mesures de pH intracellulaire conduisent à montrer l'existence d'un compartiment acide chez Plasmodium (35,63). Il est même possible de montrer par fluorescence que ce compartiment correspond à des zones bien localisées dans le parasite, () mais la nature et la fonction de ces compartiments ne peuvent être précisées. Les valeurs de pH obtenues par plusieurs auteurs avec des méthodes différentes sont convergentes et conduisent à une valeur de l'ordre de 5 unités de pH (63).

Une activité phosphatase acide a été également révélée et localisée dans des vésicules chez P.berghei (2). C. Slomianny dans un travail récent vient de montrer que cette même activité se retrouve dans des vésicules d'endocytose néo-formées (50).

Enfin il est indéniable que le parasite possède une endoprotéase acide capable de dégrader l'hémoglobine (3,37).

L'ensemble de ces éléments conduit à démontrer l'existence d'un compartiment acide chez Plasmodium, mais il n'est pas démontré que ce compartiment est le siège de la dégradation de l'hémoglobine, et qu'il constitue le site de concentration de la chloroquine. Néanmoins, une étude réalisée en 1972 par M. Aikawa (1), portant sur la localisation de chloroquine tritiée chez P.berghei, suggère que la vacuole digestive est le site de concentration de la chloroquine. Ce travail a été réalisé dans des conditions expérimentales non concluantes, et ne permet pas en réalité d'aboutir à une démonstration rigoureuse. Nous analyserons ultérieurement les limites de cette méthode.

Le mécanisme de concentration lysosomiale a été proposé pour les molécules de type quinine où seul l'azote de la chaîne latérale est assez basique pour capter un proton au pH physiologique.

Pour la quinine, les valeurs de pKa pour les fonctions aminées du noyau quinoléique et de la chaîne latérale sont respectivement : 4,3 et 8,4. Au pH physiologique, les différentes formes de quinine sont dans les proportions suivantes : 89 % sous forme monoprotinée et 11 % sous forme neutre (24).

3) Interaction chloroquine-hématine

Récemment, Chou et al. (10) reprenaient une observation faite dès 1963 (49) selon laquelle la chloroquine interagit avec l'hématine libérée par action protéolytique du Plasmodium sur l'hémoglobine.

Ils montrent que la chloroquine, in vitro, présente une forte affinité pour un produit de dégradation de l'hémoglobine, qui présente une forte absorption à 380 nm, la ferriprotoporphyrine IX ou hématine. La constante de dissociation du complexe chloroquine-hématine obtenue par dialyse à l'équilibre est de $3,5 \cdot 10^{-9}M$. Ils montrent également que cette affinité élevée de la chloroquine pour l'hématine est inhibée par des antimalariques tels que la quinine, la méfloquine.

Des études réalisées à l'aide de la spectroscopie ultraviolet ont montré l'existence d'une interaction entre hématine et divers schizonticides, mais elles ne permettent pas d'accéder à la géométrie de l'interaction. Une liaison entre l'azote quinuclidique de la quinine et l'atome de fer de la porphyrine a été montrée par spectroscopie ultraviolet (58). Malheureusement, cette étude réalisée en milieu non aqueux (benzène) s'éloigne notablement des conditions naturelles. Son intérêt biologique est donc contestable.

Chou et Fitch (10) proposent que la concentration intraparasitaire de la chloroquine soit due à l'interaction chloroquine-hématine grâce à la libération de la porphyrine lors de la dégradation de l'hémoglobine par le parasite. Ils supposent que cette interaction ne se produit que lors

de la formation de l'hématine. Le pigment malarique complètement constitué n'ayant aucune affinité pour la chloroquine (22). De plus, ils proposent que l'activité antimalarique de la chloroquine s'exprime par l'intermédiaire du complexe chloroquine-hématine (5), et que le résultat de cette activité se traduit par la lyse des membranes du parasite (11).

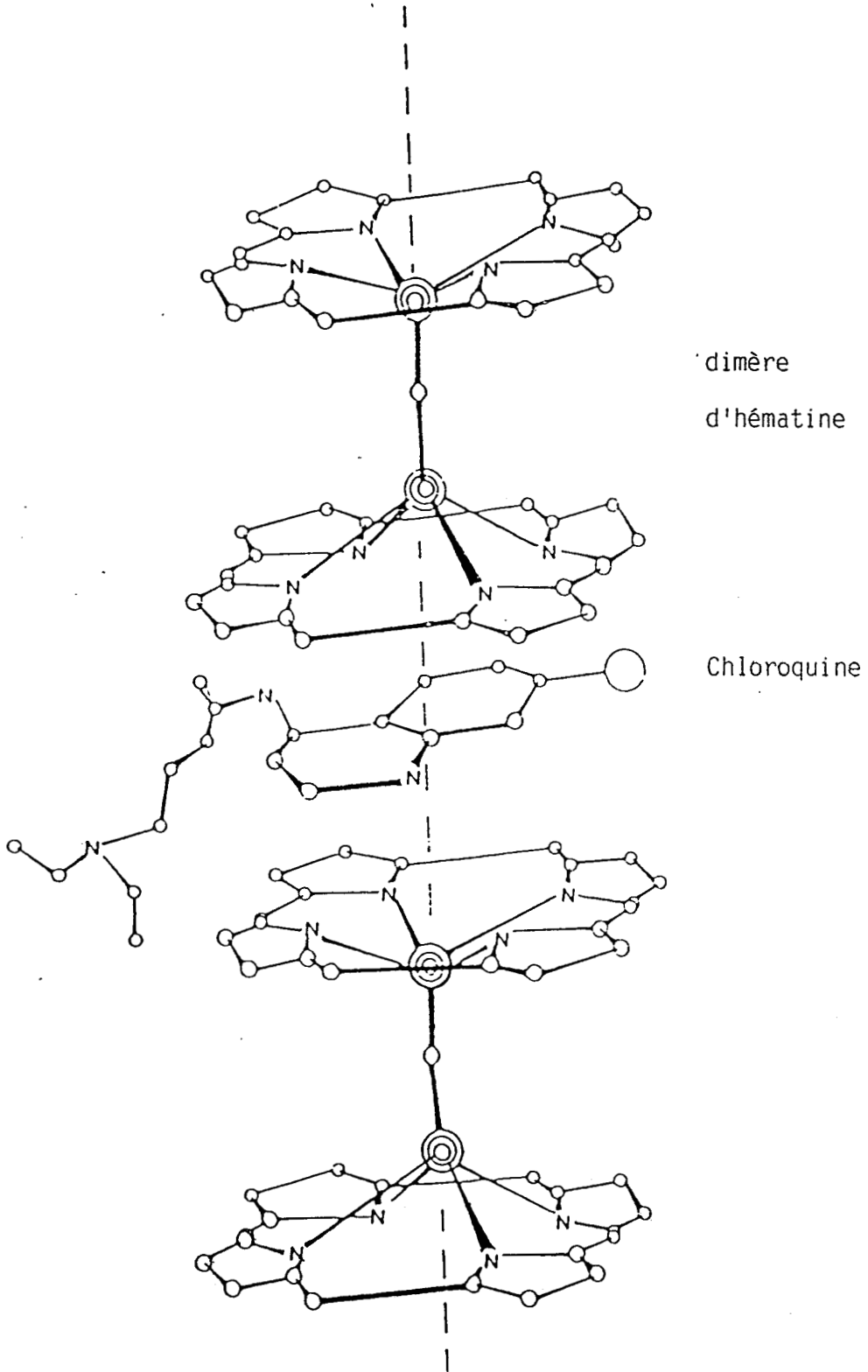
Malheureusement, les études ultrastructurales réalisées sur les effets de la chloroquine chez Plasmodium sont en contradiction avec cette proposition. Il n'a jamais été observé de lyse des membranes du parasite ou des vacuoles digestives (50,66).

D'autre part, des études réalisées par RMN sur la structure du complexe chloroquine-porphyrine, en milieu aqueux (41) (Fig.D) montrent que l'hématine ne peut constituer le récepteur des schizonticides sanguins. En effet, les 2 atomes essentiels à l'activité antimalarique de la chloroquine : atome de chlore en position 7 et l'azote de la chaîne latérale, ne participent pas à la formation du complexe. Il n'y a donc pas de relation entre l'aptitude à interagir avec l'hématine, et l'activité biologique de la chloroquine. Ceci a été confirmé en examinant la spécificité de l'interaction hématine-chloroquine à l'aide de diverses molécules modèles (40). Il a été ainsi montré que des molécules présentant un noyau aromatique, mais ne possédant pas obligatoirement une activité antimalarique, avaient une affinité importante pour l'hématine (k_d $10^{-6}M$).

Enfin la présence du complexe chloroquine-hématine n'a jamais pu être mise en évidence in vivo.

La proposition de Fitch et coll. nous semble donc actuellement peu satisfaisante pour expliquer le mécanisme d'action de la chloroquine.

Figure D - Interaction chloroquine - hématine



IV - CONCLUSION

Cette analyse de l'ensemble des travaux réalisés dans le but de clarifier le mode d'action des schizonticides sanguins montre que l'hypothèse la plus satisfaisante est celle faisant intervenir les propriétés lysosomotropes de la chloroquine.

Cette voie d'approche nous apparaît néanmoins présenter des incertitudes sur deux points essentiels :

- le site de concentration de la chloroquine dans le parasite.
- la nature et la localisation du compartiment acide de Plasmodium.

Nous nous proposons donc d'étudier conjointement ces deux aspects.

Nous avons choisi d'aborder cette étude avec une méthode expérimentale permettant une visualisation directe, des compartiments acides cellulaires, et des sites de rétention de la chloroquine. Pour cela, l'immunodétection sur coupes ultrafines nous a semblé seule capable d'atteindre la précision souhaitée. Le chapitre suivant analyse en détail la méthode adoptée.

RESULTATS

SONDES MOLECULAIRES

En 1984, Anderson et al. (4) présentaient une méthode originale pour la visualisation des organites acides des cellules par microscopie électronique. Celle-ci reposait sur l'immunodétection d'une molécule (le DAMP) (Fig. E) ayant la propriété de se concentrer dans les compartiments acides cellulaires. Il montre que le DAMP se concentre dans diverses structures telles que les lysosomes, endosomes, de fibroblastes en culture.

Considérant ce type d'approche nous avons conçu et réalisé une sonde moléculaire (CQA) (Fig. E), analogue de la chloroquine permettant la localisation ultrastructurale des sites de concentration de cette molécule chez Plasmodium.

Du point de vue expérimental, nous avons utilisé les deux sondes moléculaires DAMP et CQA pour la détermination conjointe des compartiments acides et des sites de rétention de la chloroquine chez les parasites.

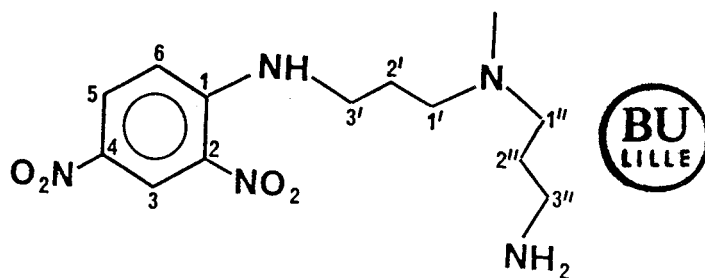
I - CONCEPTION DES SONDES

Les deux molécules utilisées présentent des particularités structurales, et des propriétés biologiques précises leur conférant les capacités mentionnées précédemment. Nous allons présenter dans le détail ces divers aspects car ils ont présidé à la conception de notre sonde CQA.

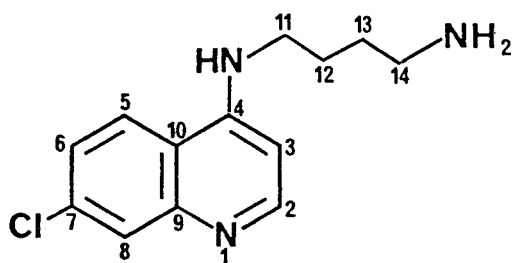
1) Structures antigéniques

L'immunodétection de ces molécules impose la présence d'une structure antigénique permettant une forte interaction antigène-anticorps. Tel est le cas de la partie dinitroaromatique du DAMP, qui peut être aisément détectée par des anticorps anti-dinitrophénol. Cette fonction est assurée essentiellement par le noyau chloroquinoléïque pour la sonde CQA.

Figure E.



DAMP



CQA

2) Propriétés biologiques

La sonde, DAMP présente deux fonctions amines primaire et tertiaire (pKa apparent 10,6) lui conférant des propriétés de base faible et donc la propriété de cibler les compartiments acides.

La sonde CQA, qui est une amino-4-quinoléïne, possède des propriétés de base faible et une activité antimalarique étroitement liées. De par sa structure, cette molécule respecte l'essentiel des relations entre structure et activité des amino-4-quinoléïnes :

- un noyau quinoléïne substitué en position 7 par un atome de chlore.
- un azote terminal sur la chaîne latérale.

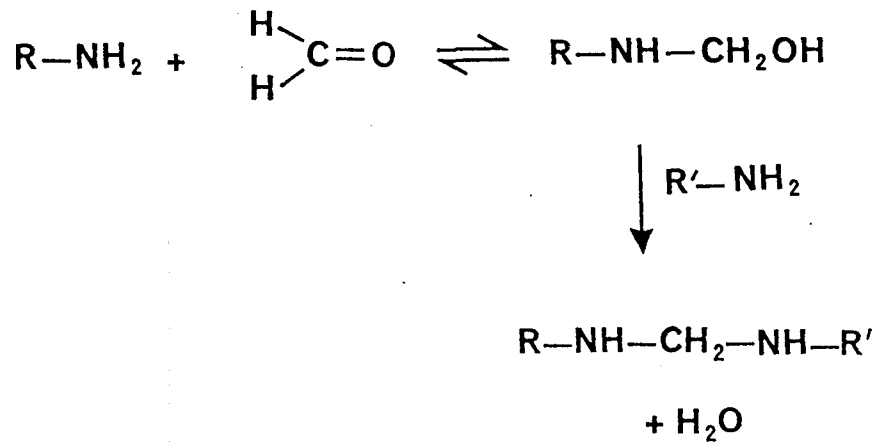
3) Réticulation

L'utilisation immunocytochimique des anticorps n'est réalisable que si les conditions suivantes sont respectées :

a) les sondes, qui ne font pas partie intégrante des structures cellulaires, doivent être maintenues par des agents de fixation (formaldéhyde, glutaraldéhyde) pour ne pas être éliminées au cours des préparations pour la microscopie électronique.

b) L'antigène doit être accessible aux anticorps dans les conditions de détection et le complexe formé doit être maintenu dans les structures observées.

Ces deux conditions sont remplies si les sondes comportent des fonctions amine primaire libre ($-NH_2$). En effet, le formaldéhyde a la propriété de créer des liens covalents entre ces fonctions selon un schéma réactionnel proposé par M.Y. Feldman (19) :



Ainsi les sondes peuvent être réticulées grâce au formaldéhyde avec les protéines cellulaires.

De même l'éventuelle interaction ligand-récepteur, drogue-récepteur, de molécules telles que la chloroquine constitue un empêchement à la détection par un anticorps de ce même ligand. La réticulation des structures protéiques au formaldéhyde, peut conduire à la perte de l'interaction ligand-récepteur. Le ligand (ou la drogue) devient ainsi accessible à une interaction avec un anticorps spécifique. Le maintien de l'antigène in situ est donc là également une nécessité, car il faut immobiliser le complexe antigène-anticorps pour le détecter.

Une démarche analogue a été adoptée pour la localisation immunocytochimique de l'acétylcholine et des neurones cholinergiques par Geffard et al. (28). L'acétylcholine a été fixée in situ grâce à un mélange complexe d'alcool allylique et de glutaraldéhyde.

4) Liaison avec les macromolécules et obtention des anticorps

Le dérivé succinylé de la sonde CQA est conjugué à une protéine, la sérumalbumine de souris (MSA) pour l'obtention d'anticorps monoclonaux. Après immunisation des souris BALB/C avec cet antigène (CQA succinylé-MSA), les cellules de la rate sont isolées.

La fusion des splénocytes avec les cellules de myélome SP2/0 est réalisée selon Galfre et al. (26).

Une fois que la sélection des hybridomes par RIA (Radio Immunology Assay) est réalisée, l'étape suivante est le clonage par la méthode du fractionnement par dilutions limites.

La prolifération de l'hybridome et, par là même, la production de son anticorps monoclonal, est réalisée in vivo sous forme d'ascite.

En ce qui concerne la sonde DAMP, sa détection se fait par l'intermédiaire d'anticorps polyclonaux antidinitrobenzène. Les lapins sont immunisés contre le conjugué DNB-RSA résultant du greffage du 1-chloro-2,4 dinitrobenzène sur la sérumalbumine bovine.

II - SYNTHESSES CHIMIQUES

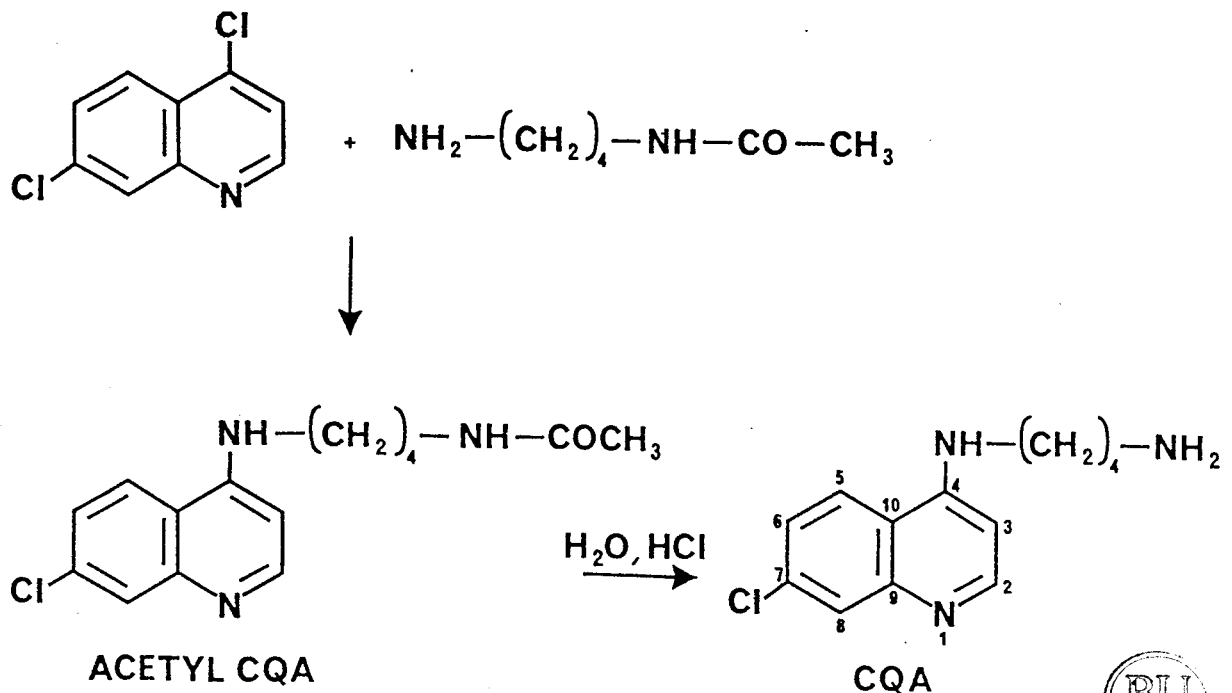
1) Synthèse de CQA (chloro-7 (amino-4-butylamino)-4 quinoléïne)

Le schéma de synthèse adopté comporte la condensation, dans le diméthylsulfoxyde, de la monoacétyldiaminobutane avec la dichloro-4,7 quinoléïne, et l'hydrolyse du produit de condensation.

Le monoacétyldiaminobutane est préparé à partir du diamino-1,4 butane et d'anhydride acétique selon Tabor et al. (56).

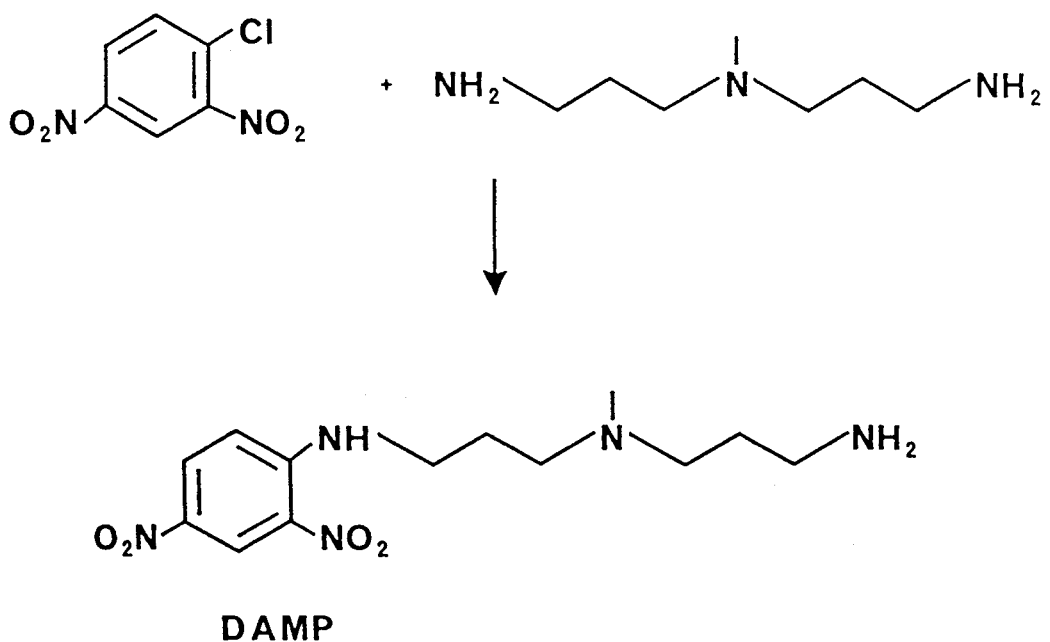
La cristallisation dans le méthanol permet d'obtenir un composé cristallin incolore de point de fusion : correspondant au dérivé dihydrochloré : CQA, 2HCl.

Les caractéristiques spectrales RMN ^1H , ^{13}C sont en plein accord avec la structure indiquée.



2) Synthèse de la sonde DAMP (N(Dinitroanilo-2,4)-3 Amino-3'méthyl-dipropylamine)

La synthèse du DAMP est effectuée selon Anderson et al. (4) par condensation de la N diamino-3,3' méthyldipropylamine et du chloro-1 dinitro-2,4 benzène dans l'acétonitrile.



Après chromatographie sur silice et préparation du chlorhydrate, on obtient un dérivé cristallisé jaune (F). Les caractéristiques spectrales (RMN ^1H , ^{13}C) sont en accord avec la structure proposée et les données mentionnées par Anderson et Coll. (4).

3) Dérivé succinylé

Le dérivé succinylé de CQA est utilisé pour le greffage de l'haptène sur une protéine porteuse. Sa synthèse est réalisée par réaction avec l'anhydride succinique en solvant pyridinique. Après évaporation du solvant, on obtient un composé qui cristallise dans le méthanol (F).

Les caractéristiques spectrales concordent avec la structure proposée.

III - PREPARATION DES CONJUGUES ANTIGENIQUES

1) CQA-MSA

Un conjugué (CQA-MSA) chloroquinoléïne, albumine de souris est utilisé comme antigène pour la production d'anticorps monoclonaux. L'albumine de souris est purifiée au laboratoire par chromatographie d'échange d'ions sur DEAE Trisocryl selon la méthode de Saint Blancard (47).

Le dérivé succinylé de CQA est greffé à l'albumine par une méthode classique au carbodiimide. Une filtration sur une colonne sephadex G-25 permet d'isoler la fraction protéique. Un dosage de protéines (BIORAD) et une mesure d'absorption à 343 nm (bande d'absorption de la quinoléïne) permettent une estimation du nombre de molécules de quinoléïne greffée par molécule d'albumine.

2°) DNB-RSA

Un conjugué dinitrobenzène, albumine de lapin est utilisé comme immunogène pour la production d'anticorps spécifiques chez le lapin.

Le chloro-1 dinitro-2,4 benzène est greffé sur l'albumine dans un mélange DMSO, H₂O selon la technique de Fleischman et coll. (25). Une filtration sur une colonne sephadex G-25 permet d'isoler la fraction protéique. Un dosage de protéines (BIORAD) et une mesure d'absorption à 347 nm (bande d'absorption du DNB) permettent une estimation du nombre de molécules de dinitrobenzène greffées sur l'albumine.

IV - PRODUCTION D'ANTICORPS

1) Anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux anti-chloroquinoléine ont été réalisés au laboratoire par B. Fortier et A. Loyens.

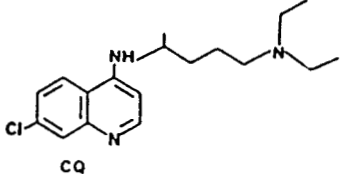
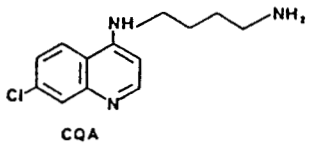
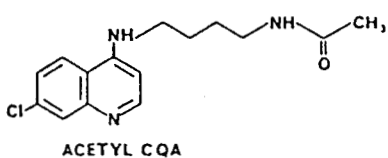
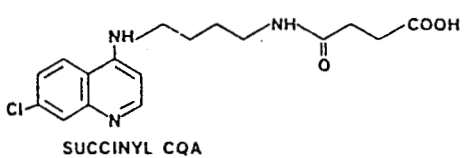
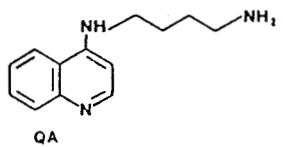
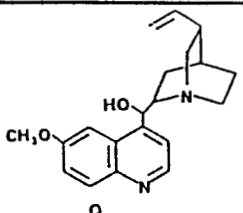
Des souris Balb/c ont été immunisées par injection intrapéritonéale du conjugué CQA-MSA. Les anticorps sont révélés à l'aide d'un test RIA utilisant de la chloroquine marquée au carbone 14. La fusion des splénocytes, prélevés 30 jours après la première injection d'antigène, a été réalisée avec des cellules de myélome SP2/0 selon la technique de Galfre et coll. (26). Les hybridomes ont été sélectionnés à l'aide du test RIA puis clonés par la méthode de dilutions limite. La production massive d'anticorps est réalisée in vivo sous forme d'ascite.

2) Anticorps polyclonaux antidinitrobenzène

Les antisérums ont été obtenus selon la méthode de Vaitukaitis et al. (57). Des lapins sont immunisés par injections intradermiques du conjugué DNB-RSA.

L'intérêt de cette technique réside dans l'obtention rapide d'immunsérums : un mois après une seule immunisation.

La présence d'anticorps est contrôlée par test ELISA.

 <p>CQ</p>	5.10^{-5} M
 <p>CQA</p>	5.10^{-6} M
 <p>ACETYL CQA</p>	5.10^{-7} M
 <p>SUCCINYL CQA</p>	5.10^{-8} M
 <p>QA</p>	5.10^{-4} M
 <p>Q</p>	10^{-3} M



V - SPECIFICITE DE L'ANTICORPS MONOCLONAL ANTI-CHLOROQUINOLEINE

A. Engels et S. Moreau ont mis au point, au laboratoire, un test ELISA pour évaluer la spécificité de reconnaissance de l'anticorps utilisé en immunodétection. Ce test est basé sur la compétition entre un antigène constitué par la quinoléine liée à l'albumine et diverses molécules de synthèse analogues de la chloroquine.

L'anticorps monoclonal, isolé à partir d'ascite de souris Balb/c, est purifié selon Saint Blancard et al. (47) par chromatographie d'affinité sur une colonne greffée avec une chloroquinoléine.

Les résultats sont exprimés en concentration en compétiteur nécessaire pour inhiber à 50 % la fixation de l'antigène sur l'anticorps monoclonal.

IMMUNODETECTION

Nous avons localisé les sites de concentration de la chloroquine ainsi que les compartiments acides chez deux souches de Plasmodium de rongeurs :

- Plasmodium berghei N (Normale, sensible à la chloroquine)
- Plasmodium berghei RC (résistante à la chloroquine).

I - EVOLUTION DES SOUCHES

1) Plasmodium berghei N

Une infestation à raison de 10^8 hématies parasitées par souris permet d'atteindre une parasitémie de 30 à 40 % à J₃ (3ème jour après l'infestation) alors que la réticulocytémie est encore normale (1 à 2 %) aussi ce jour est choisi pour sacrifier les souris. A J₅-J₆, la parasitémie est voisine de 80 à 90 %, et la souris meurt.

On peut donc considérer que P.berghei N, dans des conditions normales de développement, est virulent et se développe essentiellement en normocytes.

2) Plasmodium berghei RC

Cette souche se développe exclusivement dans les réticulocytes. L'évolution de la parasitémie est plus lente du fait de la montée progressive de la réticulocytémie.

La parasitémie en réticulocytes est voisine de 40 % à J₁₄, aussi avons-nous choisi ce jour pour immoler les souris parasitées.

3) Plasmodium yoelii nigeriensis

Après passage mécanique, par voie intrapéritonéale, le développement de P.yoelii nigeriensis est rapide puisqu'il entraîne la mort de la souris en six jours.

Comme chez P.berghei N, seuls les normocytes sont parasités.

II - LOCALISATION DES AMINO-4-QUINOLEINES

Avant de localiser les sites de concentration de cette catégorie de schizonticides sanguins, et en particulier de la chloroquine, nous allons donner les propriétés biologiques de l'analogue de la chloroquine, la sonde CQA.

1) Tests biologiques

La sonde CQA conserve les effets biologiques de la chloroquine :

a) Le test de 4 jours (45) permet d'évaluer l'activité antimalarique d'un composé. Il indique la dose journalière nécessaire, pendant 4 jours consécutifs, pour inhiber le développement du parasite.

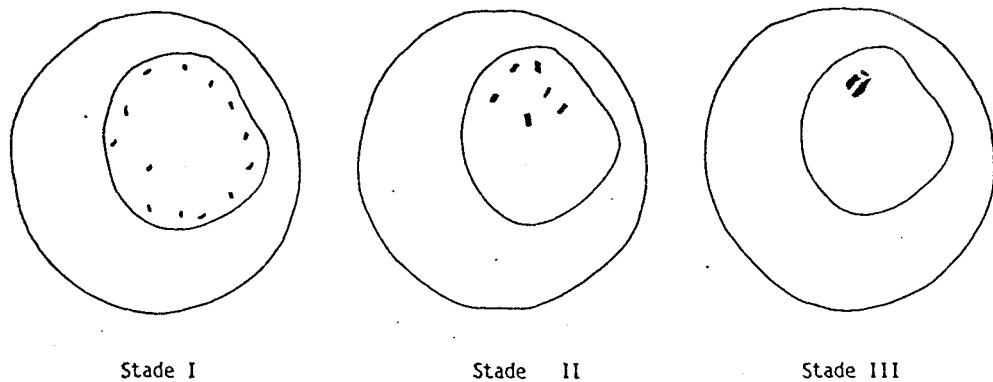
Nous utilisons pour ce test la souche P.yoelii nigeriensis qui se développe rapidement sur souris swiss. Nous exprimons le résultat sous la forme de la dose quotidienne nécessaire pour l'inhibition totale du développement du parasite. Cette dose est de 5 mg/kg pour la chloroquine et de 10 mg/kg pour son analogue, la CQA.

b) Le test de coalescence du pigment proposé par D. Warhurst (60) permet une évaluation complémentaire de l'activité biologique d'un composé sur le parasite. Il traduit un effet biologique de la molécule testée sur le parasite. Cet effet est spécifique des amino-4-quinoléïnes et observable en microscopie optique. Sa mise en oeuvre consiste à injecter in vivo une

dose unique du composé à tester à des souris parasitées par P.yoelii nigeriensis (parasitémie moyenne 20 %).

La lecture du test se fait sur des frottis sanguins fixés, non colorés.

L'évolution de la coalescence du pigment peut se résumer par le schéma suivant :



L'activité est mesurée par le pourcentage de stades III observés après 1 heure de traitement.

Pour la chloroquine, on observe 63 % de stades III pour une dose de 20 mg/kg. En comparaison, on compte, pour la sonde CQA, 58 % de stades III pour la dose de 20 mg/kg.

2) Immunolocalisation de la sonde CQA

Des souris parasitées reçoivent une injection intrapéritonéale de CQA de 20 mg/kg. Trente minutes après, le sang est prélevé soit par saignée rétro-orbitale soit par ponction de la cavité sous brachiale et est fixé par un mélange formaldéhyde-glutaraldéhyde.

Après imprégnation dans un cryopréservateur, glycérol-DMSO, les échantillons sanguins sont congelés dans l'azote liquide. Des coupes à congélation ultrafines sont effectuées à -100°C sur un ultracryotome. L'immunodétection est réalisée sur les coupes en utilisant un anticorps monoclonal (sous forme d'ascite). La protéine A marquée à l'or colloïdal permet la révélation du complexe antigène anticorps.

L'immunodétection ultrastructurale de la sonde CQA se traduit donc par un marquage représenté par des grains d'or opaques aux électrons.

Les expériences sont faites en parallèle sur des souris témoins parasitées non traitées.

a) Plasmodium berghei N

Sur les coupes réalisées sur le sang des souris témoins parasitées non traitées, le cytoplasme érythrocytaire ainsi que le parasite ne présentent aucun marquage (Planche I).

En ce qui concerne, l'échantillon sanguin provenant des souris parasitées traitées, le marquage est détecté en des lieux précis du parasite. Il apparaît concentré, dans :

- les vacuoles digestives (ou vacuoles d'endocytose pigmentaires ou non), où la dégradation de l'hémoglobine est effective, montrant soit une matrice plus dense que le stroma érythrocytaire (VNP) soit contenant des cristaux de pigment (VP) (Planche I).

- les vacuoles autophages (VA), induites par le traitement, où nous notons la présence de vésicules d'endocytose, pigmentées ou non, (planche II et III) et des fragments du cytoplasme parasitaire (CP) (Planche II).

- les vacuoles résiduelles (VR) dans les schizontes âgés (Planche II).

Le noyau (N), le cytoplasme parasitaire ainsi que le stroma érythrocytaire sont exempts de marquage.

Nous notons également l'absence de marquage dans les vacuoles d'endocytose en formation (VF), encore en relation avec le stroma érythrocytaire.

Afin de suivre l'évolution du marquage au cours du temps, nous avons fait une cinétique d'incorporation de la sonde CQA aux temps suivants :

2 minutes - 10 minutes - 30 minutes et 60 minutes (planche III).

Deux minutes après injection de la sonde CQA, seul le cytoplasme de la cellule-hôte est marqué.

Après dix minutes de traitement, les vacuoles digestives dispersées dans le cytoplasme parasitaire sont marquées.

Au bout de trente minutes, les vacuoles d'endocytose marquées se rassemblent et fusionnent pour ne plus former, au bout d'une heure, que deux ou trois grosses vacuoles digestives marquées.

b) Plasmodium berghei RC

La planche V montre le résultat de l'immunodétection de CQA, sur la souche P.berghei RC. Les grains d'or sont répartis sur l'ensemble du cytoplasme parasitaire. Comme précédemment, le noyau, les vacuoles digestives en formation (VF) ainsi que le cytoplasme de la cellule-hôte sont exempts de marquage (Planche IV). Les vésicules de micropynocytose ou vacuoles digestives ne concentrent pas particulièrement la sonde. Des très nombreuses observations réalisées, nous n'avons pu obtenir qu'exceptionnellement des images de vacuoles pigmentaires où l'on peut observer une concentration du marqueur (planche V-3).

Les globules blancs (granulocytes neutrophiles), présents dans nos échantillons sanguins, ne montrent jamais de marquage au niveau de leurs granulations (Gr) ni de leur cytoplasme (planche V). Les monocytes sont exempts de marquage (planche V).

3) Discussion

Les premiers résultats sur la détection et la localisation d' amino-4-quinoléïnes appellent quelques commentaires.

Le premier point à souligner, est que la méthode d'immunodétection utilisée permet effectivement de détecter la sonde choisie dans le parasite, après administration d'une dose unique de 20 mg/kg. Dans les mêmes conditions expérimentales (20 mg/kg), nous n'avons pas réussi à détecter ni la chloroquine, ni le dérivé acétyl-CQA. De par leurs structures, ces deux molécules ne peuvent être réticulées par le formaldéhyde et donc retenue dans les structures du parasite. Néanmoins, il faut souligner que l'anticorps monoclonal utilisé possède une affinité plus faible pour la chloroquine que pour CQA, diminuant ainsi la sensibilité de la méthode de détection. Tel n'est pas le cas de l'acétyl-CQA pour lequel l'anticorps possède une forte affinité.

Chez la souche P.berghei N, l' amino-4-quinoléïne est détectée uniquement dans les vacuoles d'endocytose. L'analyse ultrastructurale et cytochimique de diverses espèces de Plasmodium a permis à C. Slomianny et coll. (53,11,54) de préciser les étapes de dégradation de l'hémoglobine. Ils ont ainsi montré que la dégradation de l'hémoglobine n'est effective que lorsque les vacuoles digestives comportent une seule membrane. En effet, le processus d'endocytose conduit à des vacuoles présentant deux membranes, une membrane interne provenant de la vacuole parasitophore, et

une membrane externe appartenant au parasite. La disparition de la membrane interne est associée à la capacité biochimique des vacuoles à dégrader l'hémoglobine (53).

Dans toutes les observations réalisées sur des coupes de P.berghei N, le marquage n'a été retrouvé que dans des vacuoles, pigmentées ou non pigmentées, ne présentant qu'une seule membrane.

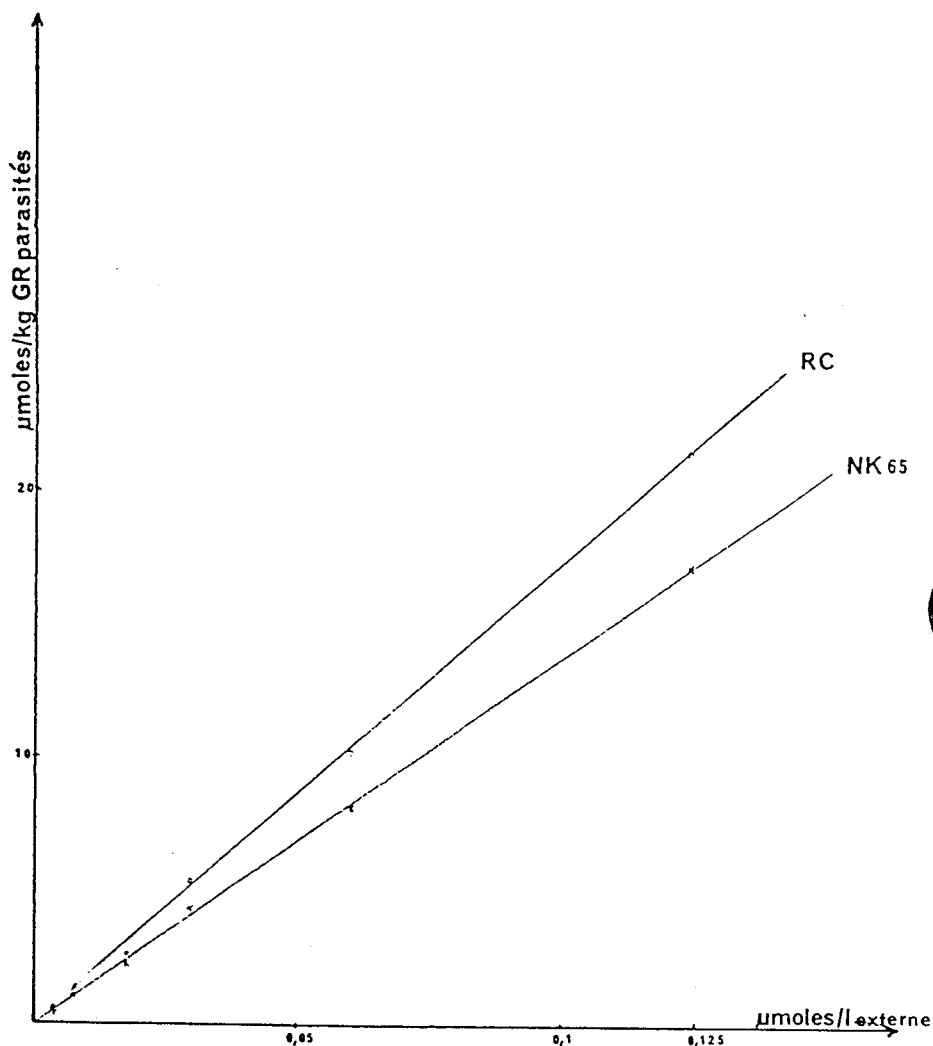
Les amino-4 quinoléïnes se concentrent donc dans les vacuoles d'endocytose du parasite, siège de la dégradation de l'hémoglobine. On peut noter également que l'effet biologique de la sonde CQA sur le parasite est manifeste. Il se traduit par une fusion prématurée des vésicules et vacuoles, pigmentées ou non pigmentées, avec la vacuole résiduelle. Cela provoque une accumulation de vésicules et vacuoles dans la vacuole résiduelle, comme observé après traitement à la chloroquine (50,65).

Les observations réalisées avec la souche P.berghei chloroquinorésistante, apportent des éléments importants dans la discussion sur le ou les mécanismes d'action de la chloroquine.

Les souches P.berghei RC sont également fortement marquées, et donc présentent une aptitude importante à concentrer les amino-4-quinoléïnes. Ceci est en contradiction avec les résultats de Macomber et coll. (38) et de Fitch (20) qui lient la résistance à la chloroquine à une chute de la capacité à concentrer cette drogue chez les souches chloroquinorésistantes.

Dans cette hypothèse, nous n'aurions pas dû retrouver un marquage important chez P.berghei RC. Néanmoins, nos résultats rejoignent les travaux de Diribe et Wharhurst (17) qui montrent que des souches résistantes diffèrent des sensibles non pas par la capacité à concentrer les antimalariques, mais plutôt par une chute de l'affinité pour ces molécules.

Il faut en effet assurer une concentration externe en chloroquine plus importante chez ces souches résistantes pour observer une concentration notable dans le parasite. Ces auteurs ont même montré que ces souches concentraient davantage de chloroquine que les souches sensibles. Ceci peut être facilement montré dans le schéma suivant :



La répartition du marquage observé sur la souche P.berghei RC constitue le fait le plus remarquable de cette étude. Le cytoplasme parasitaire des souches résistantes présente la capacité à retenir, de manière notable, les amino-4-quinoléïnes et constitue donc un site de concentration pour ces drogues. Les vacuoles digestives de cette souche ne présentent pas

de propriétés particulières à concentrer ces mêmes molécules, comme le montre la répartition du marqueur. Morphologiquement, cette souche diffère de la souche chloroquino-sensible par une moindre pigmentation et par un système vésiculaire plus abondant (53).

L'analyse globale de nos résultats montre que l'on observe deux sites distincts de fixation des amino-4-quinoléïnes : les vacuoles digestives du parasite et le cytoplasme parasitaire. Ces sites sont respectivement liés à la sensibilité et à la résistance à ces médicaments. Ceci montre donc que la concentration des amino-4 quinoléïnes dans la vacuole digestive parasitaire est une condition nécessaire pour l'activité biologique de ces molécules. Il est donc très probable que l'activité antimalarique de ces drogues soit liée à une activité sur ces systèmes vacuolaires.

Il est frappant de constater également que dans nos conditions expérimentales les globules blancs des souris parasitées ne retiennent pas la sonde, et que leurs lysosomes, en particulier, ne concentrent pas cette base faible que constitue CQA. Ceci semble souligner que les Plasmodium intraérythrocytaires constituent une cible privilégiée vis-à-vis de cette catégorie de molécules.

III - LOCALISATION DE LA SONDE DAMP

La sonde DAMP, utilisée in vitro par Anderson, possède la propriété de se concentrer dans les lysosomes. Cette sonde nous a permis de localiser les compartiments acides in vivo chez les Plasmodium de rongeurs.

Cette sonde est injectée par voie intrapéritonéale à des souris parasitées à raison de 200 mg/kg. Des essais à des doses plus faibles 20-50-100 et 150 mg/kg ont été réalisés mais seule la dose 200 mg/kg a pu être détectée par notre méthode.

Trente minutes après le traitement, l'échantillon sanguin est préparé selon la méthode décrite dans le chapitre précédent, concernant la sonde CQA. L'incubation des coupes à congélation est faite en présence d'anticorps polyclonaux. La révélation est faite par la protéine A marquée à l'or colloïdal.

1) Plasmodium berghei N :

Les particules d'or révélant la présence de la sonde se concentrent dans les vacuoles digestives pigmentaires (VP) ainsi que celles ne contenant pas de pigment malarique (VNP) (Planche VI).

Les vacuoles d'endocytose en formation (VF), où la dégradation de l'hémoglobine n'a pas débuté ne présentent pas de marquage (planche VI).

Le noyau et le cytoplasme ne sont jamais marqués (planche VI).

2) Plasmodium berghei RC :

La sonde DAMP est également aisément détectée sur cette souche. Les particules d'or sont réparties sur l'ensemble du cytoplasme parasitaire (planche VII). Les vésicules de pinocytose caractéristiques de cette souche ne sont pas particulièrement marquées. Nous observons cependant, dans ces conditions, quelques vacuoles plus importantes en volume qui retiennent notablement le DAMP. Le noyau n'est jamais marqué. Enfin, le cytoplasme de la cellule-hôte, le réticulocyte, présente également un marquage diffus (planche VII).

Les témoins, représentés par des coupes ultrafines effectuées sur des échantillons sanguins de souris parasitées non traitées, ne montrent pas de marquage.

Les globules blancs trouvés dans nos échantillons sanguins montrent la présence de particules d'or révélant donc la fixation de la sonde DAMP. On observe une concentration du marquage au niveau :

- des phagolysosomes (PH) des granulocytes neutrophiles (Planche VIII).

- des phagolysosomes (PH) ainsi que des granulations éosinophiles (GE) des cellules polynucléaires éosinophiles (Planche VIII).

3) Discussion

L'immunodétection de la sonde DAMP chez P.berghei N révèle la présence de compartiments acides bien identifiables. Cette analyse ultrastructurale permet de montrer, comme nous l'avons souligné dans la discussion du chapitre précédent, que ces compartiments acides, constitués par des vésicules et des vacuoles à membrane unique, sont le siège de la dégradation de l'hémoglobine. Ce résultat constitue la première identification directe, dans des conditions expérimentales respectant l'intégrité biologique du parasite, des organites acides de P.berghei.

Nous démontrons clairement, ici, que les vésicules et vacuoles digestives du parasite présentent un caractère acide lorsqu'elles dégradent effectivement l'hémoglobine.

Les résultats observés au cours de la détection du DAMP sur la souche P.berghei chloroquino-résistante appellent plusieurs remarques.

La présence du DAMP dans le cytoplasme parasitaire de cette souche conduit à penser que ce compartiment est acide par rapport à l'environnement de la cellule. Il faut souligner, à ce propos, que cette sonde ne permet pas d'accéder à une mesure de pH mais qu'elle reflète la présence de compartiment à bas pH dans un environnement déterminé.

Sur cette souche P.berghei RC, le DAMP révèle également la présence de vacuoles digestives pigmentées acides. La taille de ces vacuoles est notablement plus importante que les vacuoles d'endocytose. Elles ne sont qu'exceptionnellement observées sur des souches non traitées ou traitées par CQA. Leur présence plus fréquente, ici, pourrait traduire un effet

spécifique du DAMP sur P.berghei RC. Une étude ultrastructurale réalisée par C.Slomianny et al. (52) sur cette souche montre que le parasite présente la particularité d'éliminer le matériel pigmentaire par exocytose. L'effet du DAMP pourrait être de ralentir ou bloquer le processus augmentant ainsi la fréquence des vacuoles pigmentaires dans le parasite.

Les vésicules de micropinocytose, peu marquées, ne concentrent pas spécifiquement la sonde. Elles ne constituent pas un compartiment particulièrement acide chez cette souche.

Enfin la présence d'un marquage plus diffus dans le cytoplasme du réticulocyte, cellule-hôte, révèle également un caractère acide pour ce compartiment.

DISCUSSION GENERALE

Le but de ce travail était d'examiner deux points essentiels liés au mécanisme d'action de la chloroquine :

- le site de concentration de la chloroquine dans les parasites
- la nature et la localisation des compartiments acides dans ces mêmes parasites.

Cette étude conjointe devait permettre de préciser le rôle du pH, dans le mécanisme de concentration des amino-4-quinoléïnes dans le parasite.

Nous avons montré dans l'analyse bibliographique que les tentatives dans ce sens, effectuées par d'autres auteurs présentaient des écueils quant au schéma expérimental adopté. Les mesures de pH étaient soit effectuées sur des parasites isolés de leur hôte (36) soit basées sur des hypothèses concernant le site et le volume du compartiment acide (63-64).

La localisation de chloroquine tritiée sur P.berghei effectuée en 1972 par M. Aikawa (1), n'était pas satisfaisante en plusieurs points. Le marquage retrouvé était très faible et caractérisé par la présence de rares grains d'argent, ne permettant pas d'assurer la localisation exacte des molécules tritiées à l'origine de l'irradiation de ces grains. Ce faible marquage était probablement dû à la perte de la chloroquine radioactive lors de la préparation des échantillons et des lavages successifs des coupes.

Nous avons essayé de contourner ces difficultés en réalisant nos travaux dans des conditions expérimentales précises :

- Incorporer les divers marqueurs dans les parasites in vivo, respectant ainsi l'équilibre biologique du parasite et de sa cellule hôte. Ceci nous a imposé le choix du modèle Plasmodium murin.

- Utiliser des sondes susceptibles d'être retenues, dans les structures cellulaires pour éviter leur élimination, tant au cours des lavages que des incubations successives, lors de la préparation des échantillons.

- Détecter ces sondes avec des méthodes assurant un pouvoir de résolution compatible avec une analyse ultrastructurale.

Nous avons dans un premier temps montré que sur une souche de P.berghei sensible à la chloroquine, on révélait aisément la présence des amino-4-quinoléïnes dans les vacuoles digestives du parasite. Ces mêmes vacuoles, sites de dégradation de l'hémoglobine, se sont révélées être les compartiments acides parasitaires. Nous démontrons ainsi, par des méthodes directes, la coïncidence entre compartiments acides parasitaires, sites de dégradation de l'hémoglobine et sites de concentration de la chloroquine. Ce résultat ne permet pas de conclure quant au mécanisme responsable de la concentration intraparasitaire de la chloroquine. Il n'exclut pas l'intervention du gradient de pH comme "moteur" de cette concentration mais ne le démontre pas.

Les résultats observés avec la souche chloroquino-résistante (P.berghei RC) apportent quelques éléments à cette discussion.

En effet, il y a là également coïncidence entre compartiment acide parasitaire (le cytoplasme du parasite) et compartiment de fixation de la chloroquine, mais ces deux sites ne coïncident plus avec le lieu de dégradation de l'hémoglobine qui reste localisé dans les vacuoles. Ceci semble indiquer que l'activité antimalarique de la chloroquine est liée à une interaction avec le site de dégradation de l'hémoglobine.

La résistance à ce médicament est donc associée à une rétention de la drogue dans le cytoplasme parasitaire. Nous montrons également que cette résistance est liée à une acidification de ce même cytoplasme. La

coïncidence entre site acide et site de concentration des amino-4-quinoléine, tant chez la souche sensible que chez la souche résistante, suggère par contre que le gradient de pH intervient dans le mécanisme de concentration des antimalariques.

On peut suggérer un mécanisme possible de résistance, pour le parasite par une modification du pH de son cytoplasme empêchant ainsi une concentration importante de la chloroquine dans la vacuole digestive. La résistance ne serait plus associée à une chute de concentration intraparasitaire globale de la chloroquine (20) mais à un défaut de concentration dans la vacuole digestive uniquement. Ce défaut de concentration semble être associé à un défaut d'acidification des vacuoles ou plutôt vésicules, et une acidification concomittante du cytoplasme.

Cette proposition doit être modulée, car nous avons montré que la souche résistante possède toujours des vacuoles résiduelles acides dont la fréquence semble liée au traitement par le DAMP.

Nous identifions donc deux sites de rétention pour la chloroquine chez Plasmodium : les vacuoles digestives d'une part et le cytoplasme d'autre part. Nous pouvons montrer que ces deux sites peuvent se rencontrer sur une même souche, en même temps. En effet, la souche P.berghei sensible traitée avec des doses croissantes de CQA, montre que l'on peut détecter simultanément la sonde dans les vacuoles digestives et le cytoplasme parasitaires.

La planche (VIII) montre la révélation de la sonde CQA chez P.berghei N après trente minutes de traitement à une dose unique de 100 mg/kg. Cette observation est à rapprocher des résultats obtenus par Diribe et Warhurst dans une étude comparative des capacités à concentrer la chloroquine pour une souche sensible (NK65) et une souche résistante (RC) (17).

Ils observent, en effet, deux sites d'affinité différente : un site de haute affinité $K_d=10^{-8} \text{ M}^{-1}$ et un site de plus faible affinité dont seules les proportions varient chez ces souches. La souche sensible présentant bien sûr la plus forte proportion en site de haute affinité (62 %) contre 27 % pour la souche P.berghei RC.

Il est tentant d'attribuer une haute affinité aux sites constitués par les vésicules et vacuoles digestives et une plus faible affinité au cytoplasme parasitaire. Il faut souligner que nous n'avons pas la preuve (dans cette expérience à haute concentration en CQA), de l'intervention du gradient de pH pour la concentration cytoplasmique des amino-4-quinoléines.

CONCLUSION

Le mode d'action des schizonticides sanguins, et en particulier celui de la chloroquine, reste encore largement méconnu, comme sont ignorés également les mécanismes responsables de l'apparition de souches résistantes à ces médicaments.

Notre travail tente d'apporter des réponses au niveau d'éléments clés du mode d'action de la chloroquine à savoir :

- sites de concentration de la chloroquine.
- nature et localisation des compartiments acides de Plasmodium.

Pour cela, nous avons conçu et synthétisé une sonde amino-4-quinoléïne (CQA) dans le but de déterminer, par immunodétection, les sites de fixation de cette molécule dans le parasite. Nous avons, d'autre part, synthétisé une sonde spécifique des compartiments cellulaires acides conçue par Anderson et al. (4). Cet auteur avait démontré qu'elle permettait une détection ultrastructurale des lysosomes cellulaires.

De l'ensemble des résultats obtenus nous pouvons retenir les apports suivants :

- le site de concentration de la chloroquine, chez une souche de Plasmodium de rongeurs (P.berghei N) sensible à ce médicament, est constitué par les vacuoles digestives du parasite.

- ces vacuoles constituent les compartiments acides de Plasmodium.

- une souche de P.berghei résistante (P.berghei RC) s'avère incapable de concentrer la chloroquine dans ses vacuoles, mais piège celle-ci au niveau de son cytoplasme.

- le cytoplasme de ce même parasite présente un caractère acide.

Ces résultats nous ont permis d'apporter quelques éléments nouveaux dans la discussion sur les mécanismes d'action et de résistance des amino-4-quinoléïnes :

* la chloroquine agit au niveau de la vacuole digestive du parasite, site de dégradation de l'hémoglobine.

* le mécanisme responsable de la concentration intraparasitaire des amino-4-quinoléines, est lié à l'existence d'un gradient de pH.

* la résistance n'est pas associée à une chute de l'aptitude du parasite à concentrer ces molécules mais plutôt à leur rétention dans le cytoplasme parasitaire.

Nous montrons donc un parallélisme important entre mécanisme de concentration de la chloroquine, site de concentration et acidité des compartiments cellulaires chez Plasmodium.

Nos résultats ne permettent toujours pas d'expliquer la particularité des schizonticides sanguins vis-à-vis des compartiments parasitaires, c'est-à-dire leur aptitude à s'y concentrer à un seuil de concentration externe bien plus bas que chez les cellules de mammifères.

Cette analyse a conduit récemment D.J. Krogstad et ses collaborateurs à proposer l'intervention de "non weak-base effects" pour expliquer les propriétés antimalariques de la chloroquine (35), et D. Warhurst à émettre l'hypothèse de l'existence d'une perméase à la chloroquine chez Plasmodium (24).

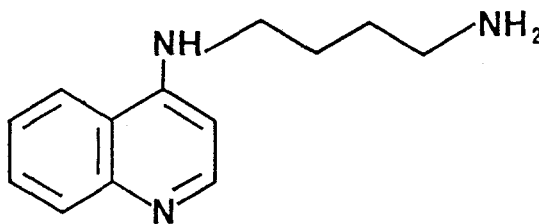
Les travaux à venir devraient essayer d'analyser les mécanismes d'action et de concentration des amino-4-quinoléines en dissociant les effets dus à leurs propriétés basiques de ceux propres à leurs activités antimalariques.

En effet, la chloroquine présente deux propriétés qui sont étroitement liées :

- base faible.
- activité antimalarique.

On pourrait espérer séparer ces propriétés en tentant de localiser chez Plasmodium une amino-4-quinoléïne, base faible, mais ayant perdu la presque totalité de son activité antimalarique.

Ce modèle pourrait être une simple amino-4-quinoléïne :



QA



Le travail effectué sur les souches de Plasmodium de rongeurs aboutit à proposer un mécanisme nouveau pour la résistance aux antimalariques : une rétention de la chloroquine dans le cytoplasme parasitaire au dépend de sa concentration dans les vacuoles digestives.

Il est important de tester l'existence de ce même mécanisme chez les souches plasmodiales humaines et en particulier P.falciparum qui développe, particulièrement, une résistance à ces médicaments.

MATERIEL ET METHODES

I - SOURIS - SOUCHES - HEMATOLOGIE ET INFESTATION

1) Hôte expérimental : souris

Nous utilisons des souris Swiss (E.O.P.S.) de l'élevage d'IFFA CREDO, souris femelles âgées de 6 à 12 semaines, pesant environ 20 g et dépourvues d'éperythrozoön.

Les souris reçoivent une nourriture conditionnée stérilisée.

2) Souches

Les souches de Plasmodium que nous utilisons pour ce travail sont les suivantes :

- P.berghei N, sensible à la chloroquine
- P.berghei RC, résistant à la chloroquine
- P.yoelii nigeriensis

a) Entretien des souches

L'entretien des souches s'effectue par passages mécaniques de la manière suivante : inoculation, par voie intrapéritonéale, d'une suspension d'hématies de souris parasitées à des souris saines à raison de 10^6 hématies parasitées dans 0,5 ml de milieu 199 par souris.

Périodiquement, nous réalisons des cycles naturels pour que la souche ne perde pas progressivement la capacité de boucler son cycle gamogonique et sporogonique.

b) Cryopréservation

En dehors de leur entretien sur animaux, les souches sont conservées congelées dans l'azote liquide.

Nous utilisons la technique de congélation en présence du diméthylsulfoxyde (D.M.S.O) :

- 50 à 60 % de sang de souris parasitée, recueilli sur héparine
- 42 à 32 % de milieu 199
- 7,5 % de D.M.S.O

Ce mélange est ensuite réparti dans les cryules (environ 1 ml par cryule).

Nous procédons à une congélation par paliers : 1 nuit à -80°C avant de passer à l'azote liquide -196°C .

Avant utilisation, les cryules sont réchauffés à 37°C et leur contenu est directement réinoculé à des souris saines, à raison de 0,5 ml par souris.

Le milieu 199 est un milieu de culture isotonique et tamponné. Il contient :

- des sels minéraux
- des amino-acides
- des vitamines
- et d'autres composants dont le rouge de phénol qui est un indicateur de pH.

Il nous est fourni, par la firme EUROBIO, sous forme de poudre à reprendre par de l'eau. Le milieu 199 ainsi régénéré est stérilisé et conservé en flacons stériles à $+4^{\circ}\text{C}$.

3) Hématologie - Infestation

a) Frottis sanguins

Ils sont réalisés à partir d'une goutte de sang recueillie à la queue de la souris, sur une lame parfaitement propre, dégraissée par du méthanol et sèche.

Les frottis, séchés instantanément, sont fixés par du méthanol pendant 1 min et colorés par une solution de GIEMSA 10 % dans un tampon de coloration de pH 7.2 contenant :

- KH_2PO_4 0.7 g
- Na_2HPO_4 1 g
- Eau distillée qsp 1000 ml

Les lames sont colorées pendant 35 min. Les lames sont ensuite rincées à l'eau du robinet, à l'eau permutée puis séchées.

b) Parasitémie

Après coloration, les frottis sont lus au microscope optique à immersion.

On appelle parasitémie le pourcentage d'hématies parasitées par rapport au nombre total d'hématies saines et parasitées.

c) La réticulocytémie

Elle est déterminée à l'aide des frottis réalisés comme précédemment.

La réticulocytémie est le pourcentage de réticulocytes par rapport au nombre total d'hématies matures et jeunes (réticulocytes).

d) Infestation

Nous effectuons des infestations massives par voie intrapéritonéale, à raison d'environ 1.10^8 hématies parasitées dans 0,5 ml de milieu 199 par souris.

4) Activités biologiques

a) Test de 4 jours

On injecte pendant quatre jours consécutifs, par voie intrapéritonéale, à des souris parasitées à 20-30 % par P.yoelii nigeriensis, la chloroquine ou la sonde CQA aux doses suivantes : 1-3-5-10 et 20 mg/kg.

Après le traitement de quatre jours, on réalise des frottis sanguins, qui après fixation et coloration au Giemsa sont lus au microscope optique à immersion.

b) Test de coalescence du pigment malarique

Une dose unique (20 mg/kg) de chloroquine ou de CQA est administrée à des souris parasitées à 20-30 % par P.yoelii nigeriensis. Des frottis sanguins sont réalisés aux temps suivants : t = 0 ; t = 15 min ; t = 30 min et t = 60 min.

Ces frottis sont fixés et non colorés.

II - SYNTHÈSE DE LA SONDE CQA (CHLORO-7 (AMINO-4-BUTYLAMINO)-4 QUINOLEINE)

- Monoacétyldiaminobutane

A une solution de diaminobutane (50 g ; 0,55 moles) dans l'acide acétique (300 ml) maintenue à 60°C on ajoute goutte à goutte, pendant une heure, l'anhydride acétique (45 ml ; 0,47 moles). Après une nuit à température ambiante, le mélange est évaporé à sec. Le résidu est repris par l'eau chaude puis on ajoute de l'acide chlorhydrique (6N) pour ajuster le pH à 1. Après évaporation à sec, le précipité est repris par l'isopropanol chaud. La fraction insoluble (le diaminobutane n'ayant pas réagi) est éliminée. De la phase soluble, on peut obtenir, par cristallisations successives dans l'isopropanol, un solide blanc (18 g ; F : 135°C).

- Chloro-7 (acétylamino-4-butylamino)-4 quinoléïne

2,2 g (0,01 M) de dichloro-4,7 quinoléïne et 2,6 g de monoacétyldiaminobutane sont chauffés à 110°C dans du DMSO (30 ml) pendant 48 heures, sous atmosphère d'azote. Le DMSO est évaporé et le résidu est chromatographié sur une colonne de silice (100 g ; 0,06-0,2 mm). On élue successivement par 250 ml de mélange chloroforme-méthanol (0 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 40 % en méthanol). Le mélange 20 % élue un composé qui cristallise dans le méthanol (1,5 g ; F :).

- Chloro-7 (amino-4-butylamino)-4 quinoléïne

Le composé précédent cristallisé est chauffé à reflux dans une solution aqueuse d'acide chlorhydrique (10 ml ; 6 N) pendant 24 heures. Après évaporation à sec, la cristallisation dans le méthanol permet d'isoler 1 g de cristaux blancs (F : 160°C) du chlorhydrate de chloro-7 (amino-4 butylamino)-4 quinoléïne.

RMN ^1H (400 MHz, DMSO) . δ (ppm, TMS)

δ = 8,48 (1H ; d ; J = 5,5 Hz ; H - 2) ; δ = 8,40 (1H ; d ; J = 9 Hz, H-5) ; δ = 7,88 (1H ; d ; J = 2 Hz ; H-8) ; δ = 7,52 (1H ; d, d ; J_1 = 9Hz, J_2 = 2Hz ; H-8) ; δ = 6,58 (1H ; d ; J = 5,5 Hz ; H-3) ; δ = 3,37 (2H ; m ; H-11) ; δ = 2,83 (2H ; m ; H-14) ; δ = 1,80 (2H ; m ; H-12) ; δ = 1,69 (2H ; m ; H-13).

RMN ^{13}C (100,62 MHz, DMSO) δ (ppm, TMS)

δ = 159,2 (C-9) ; δ = 146,4 (C-2) ; δ = 142,3 (C-7)* ; δ = 141,7 (C-4)* ; δ = 130,5 (C-5) ; δ = 130,1 (C-8) ; δ = 122,7 (C-6) ; δ = 119,3 (C-10) ; δ = 102,5 (C-3) ; δ = 46,5 (C-11) ; δ = 41,2 (C-14) ; δ = 29,5 (C-12)** ; δ = 29,0 (C-13)**.

* ; ** = attributions réversibles.

III - SYNTHÈSE DE LA SONDE DAMP (N-DINITROANILO-2,4)-3 AMINO-3' METHYLDIPROPYLAMINE

On porte à reflux une solution d'acétonitrile (50 ml) contenant le chloro-1-dinitro-2,4 benzène (1,1 g ; 0,005 moles) et la N, N' (propylamino-3) méthylamine (3,5 g ; 0,025 moles). Après 24 heures on évapore le solvant, le résidu huileux est chromatographié sur silice (100 g ; 0,06-0,2 mm) par élution de 250 ml de mélange méthanol-ammoniacal (0 %, 3 %, 8 %) pour éliminer la diamine en excès.

Le composé final est isolé sous forme de chlorhydrate après traitement par une solution éthanolique d'acide chlorhydrique. On obtient 355 mg de cristaux jaunes orangés (F :).

RMN ^1H (400 MHz, D_2O) ; δ (ppm, TMSP)

$\delta = 9$ (1H ; d ; J = 3,4 Hz ; H-3) ; $\delta = 8,3$ (1H ; d, d ; $J_1 = 3,4$ Hz, $J_2 = 6,8$ Hz ; H-5) ; $\delta = 7,2$ (1H ; d ; J = 6,8 Hz ; H-6) ; $\delta = 3,36$ (2H ; m ; H-3') ; $\delta = 3,62$ (4H ; m ; H-1', H-1'') ; $\delta = 3,11$ (2H ; t ; J = 7,1 Hz ; H-3'') ; $\delta = 2,93$ (3H ; s ; N-CH₃) ; $\delta = 2,2$ (4H ; m ; H-2', H-2'').

RMN ^{13}C (100,62 MHz, D_2O) ; δ (ppm, TMSP)

$\delta = 151,16$ (C-2)	$\delta = 137,7$ (C-1)	$\delta = 133,11$ (C-4)
$\delta = 132,36$ (C-5)	$\delta = 126,7$ (C-6)	$\delta = 117,5$ (C-3)
$\delta = 56,7$ (C-3')	$\delta = 55,8$ (C-3'')	$\delta = 42,8$ (C-1')
$\delta = 42,64$ (N-CH ₃)	$\delta = 39,4$ (C-1'')	$\delta = 26,0$ (C-2')
$\delta = 24,91$ (C-2'')		

IV PREPARATION DES CONJUGUES HAPTENE-PROTEINE

1) CQA-MSA

a) Synthèse du dérivé succinylé de CQA

A 125 mg de CQA base (0,0005 moles) dans 1,5 ml de DMSO, on ajoute 55 mg d'anhydride succinique (0,00055 moles).

Après 2 heures à température ambiante, on évapore le DMSO. Une chromatographie sur colonne de silice (10 g ; 0,06-0,2 mm) éluée par un mélange méthanol-ammoniaque (5%) permet d'isoler une fraction qui, après traitement par éthanol, HCl, cristallise sous forme de cristaux blancs (70 mg ; F :) : c'est le dérivé chlorhydrate du succinyl CQA.

RMN ¹H (400 MHz, DMSO) ; δ (ppm, TMS)

δ = 8,48 (1H ; d ; J = 5,5 Hz ; H-2) ; δ = 8,37 (1H ; d ; J = 9 Hz ; H-5) ;
δ = 7,9 (1H ; large ; N-H) ; δ = 7,87 (1H ; d ; J = 2,2 Hz ; H-8) ; δ =
7,52 (1H ; d , d ; J₁ = 9 Hz ; J₂ = 2,2 Hz ; H-6) ; δ = 7,39 (1H ; large ;
N-H) ; δ = 6,56 (1H ; d ; J = 5,5 Hz ; H-3) ; δ = 3,36 (2H ; q ; J = 5,4 Hz
; H-11) ; δ = 3,20 (2H ; q ; J = 5,8 Hz ; H-14) ; δ = 2,53 (2H ; t ; J =
5,5 Hz ; H-16) ; δ = 2,40 (2H ; t ; J = 5,5 Hz ; H-17) ; δ = 1,75 (2H ; m ;
H-12) ; δ = 1,60 (2H ; m ; H-13).

RMN ¹³C (100,62 MHz, DMSO) ; δ (ppm, TMS)

δ = 177,8 (C-18)	δ = 174,78 (C-15)	δ = 155,71 (C-2)
δ = 154,03 (C-7)*	δ = 152,9 (C-9)*	δ = 137,28 (C-4)
δ = 131,28 (C-8)	δ = 128,01 (C-5)	δ = 127,88 (C-6)
δ = 121,35 (C-10)	δ = 102,57 (C-3)	δ = 46,06 (C-11)
δ = 42,15 (C-14)	δ = 34,07 (C-16)	δ = 33,28 (C-17)
δ = 30,79 (C-12)	δ = 29,12 (C-13)	

b) Greffage du dérivé succinylé de CQA sur la MSA

5 mg de dérivé succinyl-CQA sont repris par 0,2 ml d'HCl 0,01N, on complète le volume à 1 ml avec du tampon PBS (pH = 7). On ajoute à cette solution 1 ml de tampon PBS pH = 5,7 contenant 5 mg d'albumine de souris. Le carbodiimide N-(Diméthylamino-3 propyl) N'-Diéthyl carbodiimide est ensuite ajouté par fraction de 5 mg à t = 0 ; 1 H et 24 H. Après 48 heures, le mélange est filtré sur colonne G-25 (PD-10). La fraction protéique est recueillie, concentrée sur l'immersible CX 10 TN (tout ce qui est inférieur à 10 000 daltons est éliminé). Ce concentré est de nouveau filtré sur une colonne PD-10. La concentration en protéines des tubes contenant la CQA-MSA est évaluée par la méthode standard de BIORAD.

2) DNB-RSA

a) Préparation de la sérumalbumine de lapin (RSA)

10 ml de sérum de lapin (400 mg d'albumine) sont chromatographiés sur une colonne de 50 ml d'affigel blue (BIORAD) préalablement rincé avec le tampon d'élution : PBS avec du NaCl 4M. Après le dépôt de l'échantillon, la colonne est lavée par 250 ml de tampon PBS, durant une nuit. L'albumine de lapin est éluée par le tampon PBS-NaCl 4 M. Les protéines sont détectées au spectrophotomètre à 280 nm. Les fractions contenant la RSA sont concentrées par dialyse contre du tampon PBS. Le concentré est déposé sur une colonne de sephadex G-25 en tampon phosphate 0,1 M pH = 7 pour éliminer le NaCl. Après passage au spectrophotomètre à 280 nm, les fractions riches en RSA sont rassemblées.

b) Greffage du DNB sur la RSA en 50 % DMSO

Nous avons utilisé la technique de Fleischman et Coll.

A 22 mg de RSA, dissous dans 0,6 ml d'eau distillée, sont ajoutés 0,4 ml de K_2CO_3 (5 % aqueux) et 1 ml de DMSO. Après addition de 22 mg d'haptène (1-chloro-2,4 dinitrobenzène), le tout est mis sous agitation pendant 4 heures à température ambiante.

L'antigène DNB-RSA est purifié par gel filtration sur G-25 (PD-10) en tampon phosphate 0,1 M pH = 7.

Après passage au spectrophotomètre à 280 nm (protéines) et à 347 nm (bande d'absorption du DNB), les fractions riches en produit de greffage (DNB-RSA) sont rassemblées.

V - PRODUCTION D'ANTICORPS POLYCLONAUX

Nous avons utilisé la méthode de Vaitukaitis et al. (57).

A 1 mg de DNB-RSA contenu dans 1 ml de tampon phosphate 0,1 M pH = 7, on ajoute 1 ml d'adjuvant complet de FREUND et 5 mg de Mycobacterium butyricum. Le mélange est soumis à une forte agitation jusqu'à l'obtention d'une émulsion stable.

L'émulsion est injectée à des lapins, pesant 2,5 à 3 Kg, par voie intradermique en 20 à 30 points d'inoculation sur le dos préalablement rasé de l'animal. Simultanément 0,5 ml de vaccin anti-coquelucheux Perthydral (Institut Pasteur) est administré par voie intramusculaire dans la cuisse du lapin.

Un mois après la première vaccination, un rappel est effectué par voie intradermique, par 1 mg de DNB-RSA, dissous dans 1 ml de tampon phosphate 0,1 M pH = 7, auquel on ajoute 1 ml d'adjuvant incomplet de FREUND et 5 mg de Mycobacterium butyricum. Des prélèvements sanguins sont effectués

chaque semaine et la présence d'anticorps est contrôlée par la technique d'E.L.I.S.A.

*** E.L.I.S.A. (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) :**

- Fixation de l'antigène DNB-RSA, dilué en tampon PBS pH = 9,6 pendant une nuit à 4°C, sur des microplaques.
 - 3 Lavages avec de l'eau distillée et 0,05 % tween 20, pour éliminer l'antigène non fixé au support.
 - Saturation avec le tampon PBS-lait gloria 5 % pendant 1 heure à 37°C (ou 1 nuit à 4°C).
 - 3 lavages avec l'eau distillée et 0,05 % tween 20.
 - Incubation avec différentes dilutions de sérum de lapin anti DNB-RSA, en tampon PBS-tween 20 0,1 % - lait gloria 5 % pendant 1 heure à 37°C.
 - 3 lavages en eau distillée - 0,05 % tween 20 de manière à éliminer l'excès de protéines n'ayant pas formé d'immunocomplexes.
 - Incubation pendant 1 h à 37°C d'un sérum de chèvre anti-lapin marqué à la peroxydase.
 - 4 lavages en eau distillée - 0,05 % tween 20, pour éliminer l'excès d'antiglobulines.
 - Révélation de l'antiglobuline par la solution d'OPD* pendant environ 5 minutes à l'obscurité.
 - La réaction est arrêtée par l'addition de 50 ul d'H₂SO₄ (2N)
- * La solution d'orthophénylène diamine (OPD) est préparée extemporanément.
- Dissoudre 4 mg d'OPD dans 10 ml de tampon citrate (0,02 M) phosphate (0,05 M) pH = 5.0
 - Ajouter 15 ul d'H₂O₂ 30 %

IV - MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

1) Préparation de l'échantillon sanguin

Le sang est prélevé, soit par saignée rétro-orbitale soit par ponction de la cavité sous brachiale, à l'aide d'une pipette pasteur préalablement effilée et héparinée. Le sang récupéré est fixé, pendant une heure à 4°C, par le mélange d'agents fixateurs : 4 % formaldéhyde et 0,1 % glutaraldéhyde en tampon PBS à pH = 7,5 (phosphate-buffered saline : 50 mM tampon phosphate, 150 mM NaCl). Après lavage en tampon PBS, les échantillons sanguins sont imprégnés, pendant une heure à température ambiante, dans un cryopréservateur : sucrose 2,2 M en PBS ou glycérol 25 % et DMSO 5 % en PBS.

Enfin, ces échantillons sanguins sont déposés sur des supports et congelés dans l'azote liquide et conservés dans des cryules à -180°C jusqu'à utilisation.

2) Coupes ultrafines

Les échantillons sanguins ainsi préparés sont coupés, à l'aide de couteaux en verre, à -100°C sur un ultracryotome type Reichert ultracut II. Les coupes à congélation sont récupérées sur du sucrose 2,3 M en PBS puis déposées sur des grilles de Nickel 100 membranées (au parlodion en solution à 0,4 % dans l'acétate d'isoamyle) et carbonées. Ces grilles sont déposées sur des gouttes de tampon PBS et 1 % ovalbumine (PBSO) durant 1 heure, pour éliminer le sucrose 2,3 M en PBS.

3) Immunomarquage

Les grilles sont ensuite transférées sur des gouttes contenant des anticorps dilués dans du tampon PBS. Nous avons utilisé deux sortes d'anticorps :

- des anticorps monoclonaux en liquide d'ascite dilués au 1/100e pour la révélation de la sonde CQA.
- des anticorps polyclonaux sous forme de sérum dilués au 1/100e pour la localisation de la sonde DAMP.

Après une heure d'incubation à 37°C en présence des anticorps, les grilles sont lavées cinq fois, par plusieurs transferts sur des gouttes de PBSO. La durée totale des lavages est de 1 H à température ambiante.

Les grilles sont ensuite incubées, durant 1 heure à 37°C, en présence de la protéine A marquée à l'or colloïdal diluée au 1/50e en PBSO.

La protéine A marquée à l'or colloïdal est préparé dans notre laboratoire selon la méthode de Slot et al. (55).

Les grilles sont lavées 4 fois avec du tampon PBSO durant 30 minutes puis 3 fois avec du tampon PBS pendant 30 minutes.

Nous rinçons les grilles à l'eau distillée.

Il est nécessaire de renforcer le contraste des préparations par une "coloration" à l'acétate d'uranyle 3 % aqueux, mais également de les "enrober" par de la méthylcellulose, pour la préservation des structures. Aussi avons-nous choisi les proportions suivantes, selon la méthode de Griffiths et al., 1982 :

- 0,2 ml d'acétate d'uranyle 3 % H₂O
- 1,8 ml de méthylcellulose

Les grilles sont mis en contact avec cette préparation durant 10 minutes à l'obscurité et sur un lit de glace pilée.

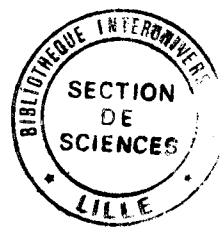
Les grilles sont montées sur "un anneau" puis séchées avec du papier filtre.

Les coupes sont prêtes pour l'observation au microscope électronique.

*** Préparation de la méthylcellulose**

Nous avons utilisé la méthylcellulose à 25 centipoise de chez Fluka AG, Buchs, Switzerland.

La poudre est ajoutée à l'eau préchauffée à 95°C pour obtenir une solution de méthylcellulose à 2 %. Après avoir mélangé avec un agitateur en verre, la mixture obtenue est déposée immédiatement sur de la glace. Pendant 24 heures et à 4°C, ce mélange est mis sous agitation, puis laissé reposer pendant 4 jours à 4°C. Après ultracentrifugation (55000 rpm avec un rotor 70 Ti ; pendant 1 heure à 4°C), les tubes sont stockés au réfrigérateur pendant 3 à 4 semaines, sans perturber le culot. Pour chaque utilisation de la solution de méthylcellulose, on prélève à la surface la quantité désirée.



Identification of distinct accumulation sites of 4-aminoquinoline in chloroquine sensitive and resistant *Plasmodium berghei* strains

Serge Moreau¹⁾, Gérard Prensier, Jamila Maalla, Bernard Fortier

INSERM U. 42, Biologie et biochimie parasitaire et fongique, Villeneuve d'Ascq/France

Received June 23, 1986

Accepted September 6, 1986



4-Aminoquinolines — accumulation sites — Plasmodium berghei — chloroquine sensitive and resistant

We report the synthesis of an analogue of chloroquine (CQA) which can be used as a probe to visualize accumulation of 4-aminoquinoline by electron microscopy. A mouse monoclonal antibody against CQA was raised and used for immunodetection by the protein-A gold method on ultrathin cryosections, of CQA treated parasites. We demonstrate that in a *P. berghei* chloroquine (CQ)-sensitive strain (N strain) the chloroquine analogue used accumulates in the endocytic vacuoles where hemoglobin (Hb) degradation is occurring. In contrast, in a *P. berghei* CQ-resistant strain (RC strain) the probe was found scattered all over the cytoplasm of the parasite. This result suggests that endocytic vacuoles of the parasite could constitute the site of antimalarial action of CQ.

Introduction

Chloroquine (CQ) is the most widely used antimalarial drug. The development of resistance to this compound is one of the major reasons for the worldwide resurgence of the disease during recent years [14]. The mode of action of the drug, as well as the mechanisms responsible for drug resistance has not been elucidated hitherto. The antimalarial effect of CQ has been attributed to the ability of *Plasmodium* infected erythrocytes to accumulate high levels of the drug [12, 7]. Resistance to CQ was related to reduced uptake of the drug by erythrocytes infected with resistant strains. Two main hypotheses have been proposed to account for the high affinity of CQ for parasitized cells. According to the first, the drug acts as a lysosomotropic agent [11] and accumulates into an acidic compartment [22]. Alternatively, the second hypothesis assumes that the compound accumulates by interacting with free ferriprotoporphyrin IX (FP), a proposed product of the parasite digestion of hemoglobin (Hb) [4, 13].

The precise intracellular localization of CQ could lead to a better understanding of the mechanisms which allow this accumulation. We report here the synthesis of an ana-

logue of chloroquine (CQA) which can be used as a probe to visualize accumulation of 4-aminoquinoline by electron microscopy.

An essential characteristic of this antimalarial probe is that it is retained in cellular structures thanks to its primary amino group after fixation with aldehydes. A mouse monoclonal antibody against CQA was raised and used for immunodetection by the protein-A gold method on ultrathin cryosections of CQA-treated parasites. We identified different accumulation sites of CQA for CQ-sensitive and CQ-resistant *P. berghei* strains.

Materials and methods

Chemical synthesis

CQA: The complete chemical scheme of CQA [7-chloro-4-(4 amino butylamino) quinoline], as well as its hemisuccinyl derivative will be reported elsewhere.

CQA-MSA: The hemisuccinyl derivative of CQA was covalently bound to mouse serum albumin using a carbodiimide.

Ten aminoquinoline molecules were bound per molecule of albumin as determined by UV spectroscopy (343 nm) and protein assay (Bio-Rad).

Chloroquine [¹⁴C]diphosphate was obtained from New England Nuclear (Boston, MA) (specific activity: 30 mCi/mmol).

Biological activities

The *in vivo* antimalarial activity of CQA was estimated using the 4-day test [3], on a *Plasmodium yoelii nigeriensis* strain, and revealed to be half that of CQ (CQ: 5 mg/kg/day; CQA: 10 mg/kg/day for curative doses). Clumping activity test was performed according to Warhurst [21] and expressed as percent of clumped pigmentation after 60 min of drug action after *in vivo* injection (20 mg/kg) on *P. berghei* infected mice; CQ: 63% of clumping; CQA: 58%.

Monoclonal antibody

BALB/c mice were immunized by two intraperitoneal injections of CQA-MSA (0.1 mg) emulsified with complete Freund adjuvant at days 0 and 8. A boost was given on day 30 by intravenous injection of CQA-MSA alone and the spleen was removed three days later. Splenocytes were fused with SP20 myeloma cells according to Galfre et al. [8]. Hybridomas were selected by a [¹⁴C]chloroquine RIA test and cloned by double limit dilution.

¹⁾ Dr. Serge Moreau, INSERM U. 42, Biologie et biochimie parasitaire et fongique, 369, rue J. Guesde, F-59650 Villeneuve d'Ascq/France.

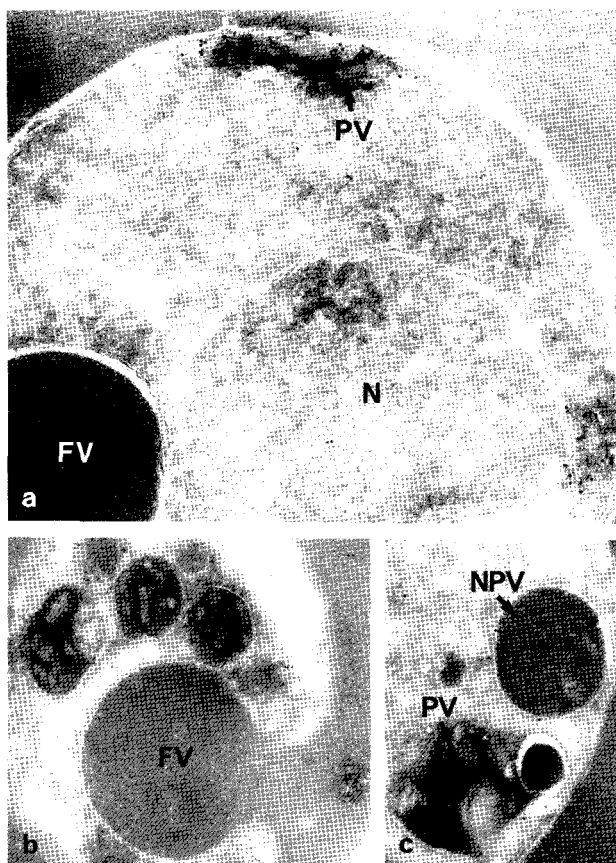


Fig. 2a. General view of a trophozoite of *P. berghei* N strain, the pigmented endocytic vacuoles (PV) are highly labelled. The forming endocytic vacuoles (FV) as well as the nucleus (N) and the greater part of the cytoplasm are not labelled. — **b.** Detail of a parasite showing the specific labelling of pigmented endocytic vacuoles. — **c.** Detail of a pigmented (PV) and nonpigmented endocytic vacuoles (NPV).

golysosome of white cells failed to accumulate CQA. This finding emphasizes the peculiar ability of CQ-sensitive and resistant *Plasmodium* cells to accumulate CQ.

We observed a highly efficient mechanism of drug uptake in a CQ-resistant strain (RC strain) which is in contrast to previous work [12, 7], but in accordance with what was recently observed by Diribe and Warhurst [6]. The main observation of this work is the correlation of resistance to 4-aminoquinoline drugs and the localization of the drug. Thus, it may be that the concentration of CQA in endocytic vacuoles is a prerequisite for antimalarial effect of the drug. Resistance to the drug could be due to a mechanism by which CQ is accumulated in an intracellular compartment of the parasite where CQ does not act. The exclusive preference of RC strain for reticulocytes [15] has also to be taken into account in the discussion on the mechanisms of drug action and resistance. These preliminary observations, based on studies using *P. berghei* strains, need to be confirmed, particularly on *P. falciparum*. The use of the aminoquinoline probe, and of the specific monoclonal antibody as exemplified here, has proven to be effective in studies on the antimalarial action of CQ;

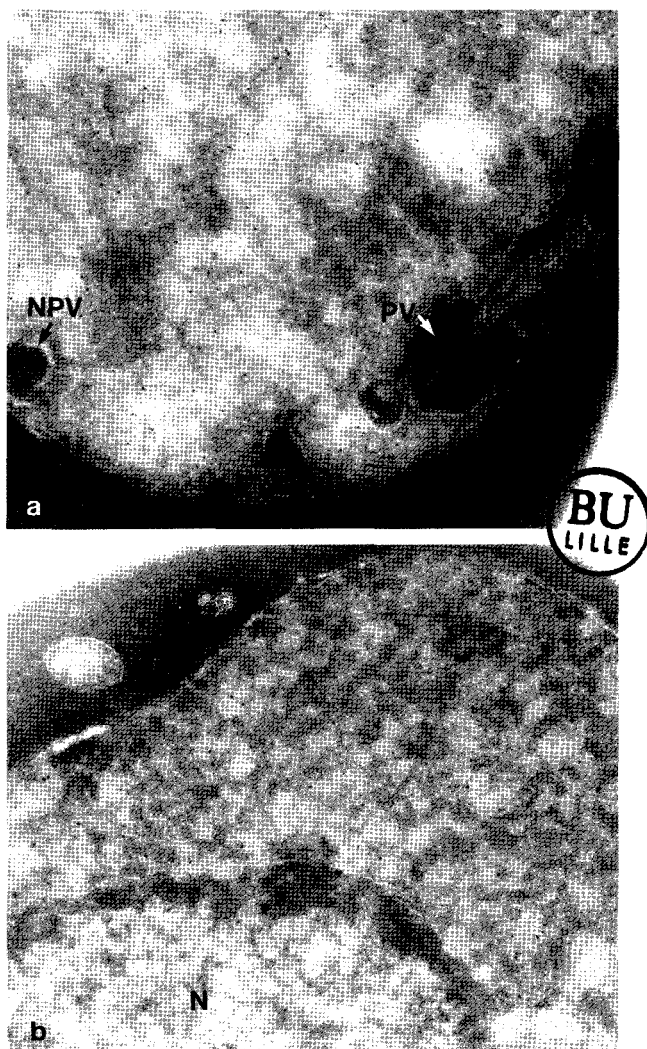


Fig. 3a. General view of a trophozoite of *P. berghei* RC. — **b.** Detail of a trophozoite of *P. berghei* RC. The nucleus (N) is not labelled.

in addition, it might be useful in exploring the CQ interactions with lysosomal functions, such as inhibition of receptor-mediated endocytosis [9].

Acknowledgements. The authors are grateful to C. Ansel, A. Engels, A. Loyens, A. Masset and M. Mortuaire for their excellent technical assistance, and M. Masurelle for typing the manuscript. — This research was supported by the malarial component of the UNDP/World Bank/WHO Special programme for Research and Training in Tropical Diseases.

References

- [1] Abraham, R., R. Hendy, P. Grasso: Formation of myeloid bodies in rat liver lysosomes after chloroquine administration. *Exp. Mol. Pathol.* **9**, 212-229 (1968).

Identification of distinct accumulation sites of 4-aminoquinoline in chloroquine sensitive and resistant *Plasmodium berghei* strains

Serge Moreau¹⁾, Gérard Prensier, Jamila Maalla, Bernard Fortier

INSERM U. 42, Biologie et biochimie parasitaire et fongique, Villeneuve d'Ascq/France

Received June 23, 1986

Accepted September 6, 1986



4-Aminoquinolines — accumulation sites — Plasmodium berghei — chloroquine sensitive and resistant

We report the synthesis of an analogue of chloroquine (CQA) which can be used as a probe to visualize accumulation of 4-aminoquinoline by electron microscopy. A mouse monoclonal antibody against CQA was raised and used for immunodetection by the protein-A gold method on ultrathin cryosections, of CQA treated parasites. We demonstrate that in a *P. berghei* chloroquine (CQ)-sensitive strain (N strain) the chloroquine analogue used accumulates in the endocytic vacuoles where hemoglobin (Hb) degradation is occurring. In contrast, in a *P. berghei* CQ-resistant strain (RC strain) the probe was found scattered all over the cytoplasm of the parasite. This result suggests that endocytic vacuoles of the parasite could constitute the site of antimalarial action of CQ.

Introduction

Chloroquine (CQ) is the most widely used antimalarial drug. The development of resistance to this compound is one of the major reasons for the worldwide resurgence of the disease during recent years [14]. The mode of action of the drug, as well as the mechanisms responsible for drug resistance has not been elucidated hitherto. The antimalarial effect of CQ has been attributed to the ability of *Plasmodium* infected erythrocytes to accumulate high levels of the drug [12, 7]. Resistance to CQ was related to reduced uptake of the drug by erythrocytes infected with resistant strains. Two main hypotheses have been proposed to account for the high affinity of CQ for parasitized cells. According to the first, the drug acts as a lysosomotropic agent [11] and accumulates into an acidic compartment [22]. Alternatively, the second hypothesis assumes that the compound accumulates by interacting with free ferriprotoporphyrin IX (FP), a proposed product of the parasite digestion of hemoglobin (Hb) [4, 13].

The precise intracellular localization of CQ could lead to a better understanding of the mechanisms which allow this accumulation. We report here the synthesis of an ana-

¹⁾ Dr. Serge Moreau, INSERM U. 42, Biologie et biochimie parasitaire et fongique, 369, rue J. Guesde, F-59650 Villeneuve d'Ascq/France.

logue of chloroquine (CQA) which can be used as a probe to visualize accumulation of 4-aminoquinoline by electron microscopy.

An essential characteristic of this antimalarial probe is that it is retained in cellular structures thanks to its primary amino group after fixation with aldehydes. A mouse monoclonal antibody against CQA was raised and used for immunodetection by the protein-A gold method on ultrathin cryosections of CQA-treated parasites. We identified different accumulation sites of CQA for CQ-sensitive and CQ-resistant *P. berghei* strains.

Materials and methods

Chemical synthesis

CQA: The complete chemical scheme of CQA [7-chloro-4-(4 amino butylamino) quinoline], as well as its hemisuccinyl derivative will be reported elsewhere.

CQA-MSA: The hemisuccinyl derivative of CQA was covalently bound to mouse serum albumin using a carbodiimide. Ten aminoquinoline molecules were bound per molecule of albumin as determined by UV spectroscopy (343 nm) and protein assay (Bio-Rad).

Chloroquine [¹⁴C]diphosphate was obtained from New England Nuclear (Boston, MA) (specific activity: 30 mCi/mmol).

Biological activities

The *in vivo* antimalarial activity of CQA was estimated using the 4-day test [3], on a *Plasmodium yoelii nigeriensis* strain, and revealed to be half that of CQ (CQ: 5 mg/kg/day; CQA: 10 mg/kg/day for curative doses). Clumping activity test was performed according to Warhurst [21] and expressed as percent of clumped pigmentation after 60 min of drug action after *in vivo* injection (20 mg/kg) on *P. berghei* infected mice; CQ: 63% of clumping; CQA: 58%.

Monoclonal antibody

BALB/c mice were immunized by two intraperitoneal injections of CQA-MSA (0.1 mg) emulsified with complete Freund adjuvant at days 0 and 8. A boost was given on day 30 by intravenous injection of CQA-MSA alone and the spleen was removed three days later. Splenocytes were fused with SP20 myeloma cells according to Galfre et al. [8]. Hybridomas were selected by a [¹⁴C]chloroquine RIA test and cloned by double limit dilution.

Electron microscopy

Swiss mice were parasitized either by *P. berghei* normal strain (N) or by *P. berghei* chloroquine-resistant strain (RC) by mechanical passage. When the parasitemia reached about 40%, the infected mice were treated by a single intraperitoneal injection of 20 mg/kg of CQA.

Thirty min after injection, samples of blood were fixed for 1 h in a mixture of 4% formaldehyde and 0.1% glutaraldehyde in phosphate-buffered saline (PBS; 50 mM phosphate buffer, pH 7.5 150 mM NaCl). After washing in PBS, samples were infused in 2.2 M sucrose in PBS, and then frozen in liquid nitrogen on ultracryotome stubs [19].

Sections were cut at -100°C on a Reichert ultracut II ultracryotome, and collected on parlodion carbon coated Ni grids.

Grids were floated first on PBS and 1% ovalbumin (PBSO) for 1 h, then transferred for 1 h to monoclonal ascitic fluid that had been diluted 1/100 with PBS. Grids were washed for 1 h in PBSO and then floated on the protein A-gold diluted in PBSO.

Colloidal gold approximately 5 nm in size was prepared according to the method of Slot et al. [18].

After several washes in PBSO and PBS, the grids were rinsed with distilled water, then mounted and stained with 2% methylcellulose and 0.3% uranyl acetate according to Griffiths [10].

Electron microscopy was performed with a Hitachi HU12A electron microscope.

The controls were run with sections receiving protein A-gold only, or unrelated ascitic monoclonal antibody before protein A-gold.

Results

A major drawback in ultrastructural localization of molecules such as CQ is that these compounds are very likely to diffuse during the processing of the cells for electron microscopic detection. For that purpose a specific probe has to be designed. In the case of CQ the probe must fulfill three criteria. First, it must preserve the main biological properties of CQ, i.e. an antimalarial activity *in vivo*, and the ability to induce pigment clumping [20], a phenomenon similar to the CQ induced autophagy in mammalian cells

[1]. Second, the probe must be retained in the biological structures during the processing of the samples for electron microscopic detection. Last, the haptenic probe must possess the ability to be covalently linked to carrier for immunization.

The complete chemical synthetic scheme of CQA (Fig. 1) will be described elsewhere. CQA has the chloroquinoleic moiety of CQ. The main difference is constituted by the primary amino group, which allows easy cross-linking with aldehyde fixatives. As reported in Materials and methods, the biological activities of CQ are maintained and particularly the clumping of hemozoin pigment was easily observed. A hemisuccinyl derivative of CQA was synthesized and covalently linked to mouse serum albumin (CQA-MSA). A monoclonal antibody against CQA-MSA was raised.

Mice infected with CQ-sensitive *P. berghei* strains (N strain) or CQ-resistant strain (RC strain) were treated with a single injection of the dihydrochloride derivative of CQA.

Immunogold detection using the monoclonal antibody revealed specific labelling of the content of single membraned endocytic vacuoles on *P. berghei* CQ-sensitive strains when pretreated by CQA (Fig. 2). When pigment crystals were present in these vesicles, the label was still evenly distributed and not concentrated on the crystals. It has been shown [15, 16] that Hb degradation occurs in these pigmented or nonpigmented single membraned vesicles. In contrast, the forming endocytic vacuoles, still connected to the erythrocytic stroma, surrounded by two membranes were never labelled (Fig. 2).

Different results were obtained when using a *P. berghei* CQ-resistant strain (RC strain). In that case gold particles were found scattered all over the parasite cytoplasm (Fig. 3). As also observed on N strain, the nucleus was never labelled. White cells (neutrophils) were also found in the blood pellet, their lysosomes as well as the cytoplasm were never labelled.

Discussion

This experimental study on the localization of a quinoline probe within the parasite needs several comments. First, the highly efficient immunodetection of the quinoline was essentially due to its fixation in tissue during the processing of the cell samples which might also be responsible for a major difference with a previous work by Aikawa [2], where detection of $[^3\text{H}]\text{CQ}$ by high resolution autoradiography was rather poor. Second, the significantly different distribution pattern for quinoline between CQ-sensitive and CQ-resistant *P. berghei* strains introduces a completely new element in the discussion on the mechanisms of drug uptake by Plasmodium infected red blood cells.

The observed localization of CQA in a CQ-sensitive strain does not allow us to decide between the two mechanisms mentioned in the introduction. The endocytic vacuoles of the parasite may constitute an acidic compartment [22] and may contain free FP as well. It must be mentioned that under similar experimental conditions, the acidic pha-

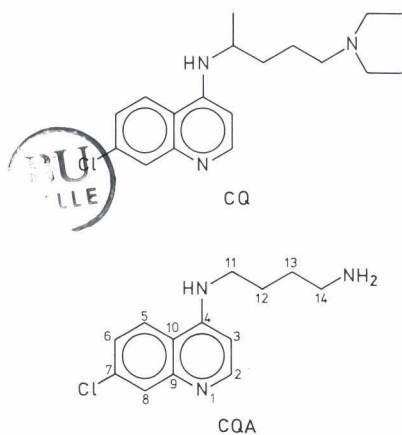


Fig. 1. Chemical structures of chloroquine [7-chloro-4-(4-diethylamino-1-methyl butylamino) quinoline]: CQ and the synthetic analogue [7-chloro-4-(4-aminobutylamino) quinoline]: CQA.

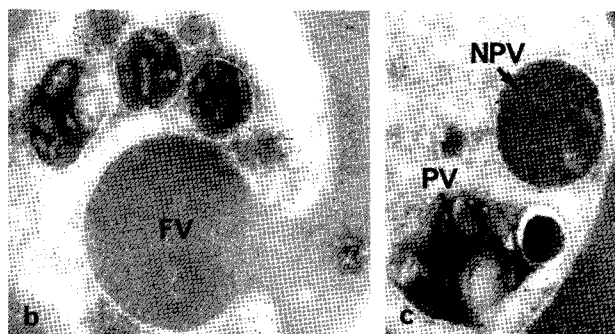
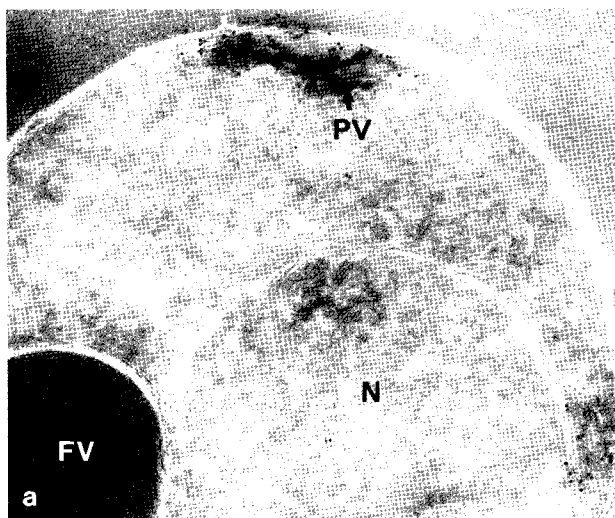


Fig. 2a. General view of a trophozoite of *P. berghei* N strain, the pigmented endocytic vacuoles (PV) are highly labelled. The forming endocytic vacuoles (FV) as well as the nucleus (N) and the greater part of the cytoplasm are not labelled. — **b.** Detail of a parasite showing the specific labelling of pigmented endocytic vacuoles. — **c.** Detail of a pigmented (PV) and nonpigmented endocytic vacuoles (NPV).

golysosome of white cells failed to accumulate CQA. This finding emphasizes the peculiar ability of CQ-sensitive and resistant *Plasmodium* cells to accumulate CQ.

We observed a highly efficient mechanism of drug uptake in a CQ-resistant strain (RC strain) which is in contrast to previous work [12, 7], but in accordance with what was recently observed by Diribe and Warhurst [6]. The main observation of this work is the correlation of resistance to 4-aminoquinoline drugs and the localization of the drug. Thus, it may be that the concentration of CQA in endocytic vacuoles is a prerequisite for antimalarial effect of the drug. Resistance to the drug could be due to a mechanism by which CQ is accumulated in an intracellular compartment of the parasite where CQ does not act. The exclusive preference of RC strain for reticulocytes [15] has also to be taken into account in the discussion on the mechanisms of drug action and resistance. These preliminary observations, based on studies using *P. berghei* strains, need to be confirmed, particularly on *P. falciparum*. The use of the aminoquinoline probe, and of the specific monoclonal antibody as exemplified here, has proven to be effective in studies on the antimalarial action of CQ;

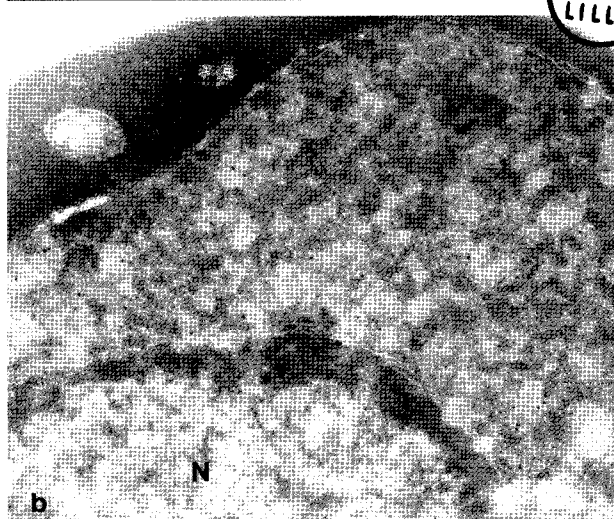
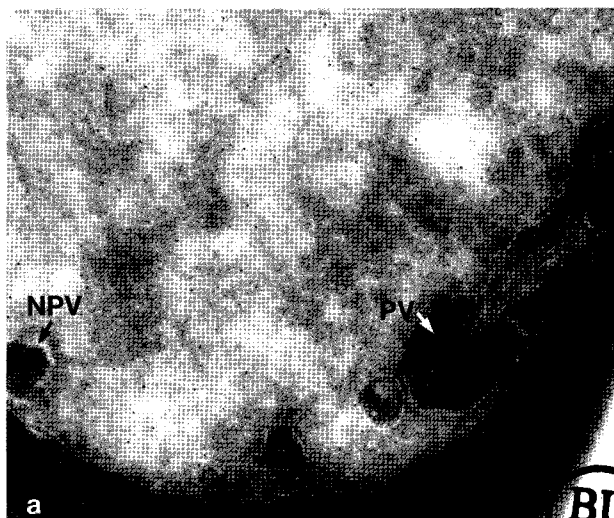


Fig. 3a. General view of a trophozoite of *P. berghei* RC. — **b.** Detail of a trophozoite of *P. berghei* RC. The nucleus (N) is not labelled.

in addition, it might be useful in exploring the CQ interactions with lysosomal functions, such as inhibition of receptor-mediated endocytosis [9].

Acknowledgements. The authors are grateful to C. Ansel, A. Engels, A. Loyens, A. Masset and M. Mortuaire for their excellent technical assistance, and M. Masarelle for typing the manuscript. — This research was supported by the malarial component of the UNDP/World Bank/WHO Special programme for Research and Training in Tropical Diseases.

References

- [1] Abraham, R., R. Hendy, P. Grasso: Formation of myeloid bodies in rat liver lysosomes after chloroquine administration. *Exp. Mol. Pathol.* **9**, 212-229 (1968).

- [2] Aikawa, M.: High-resolution autoradiography of malarial parasites treated with [³H]chloroquine. *Am. J. Pathol.* **67**, 277-284 (1972).
- [3] Ager, A. L.: Rodent Malaria Models. in: W. Peters, W. H. G. Richards (eds.): *Antimalarial drugs I*. p. 229. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo 1984.
- [4] Chou, A. C., R. Chevli, C. D. Fitch: Ferritoporphyrin IX fulfills the criteria for identification as the chloroquine receptor for malaria parasites. *Biochemistry* **19**, 1543-1549 (1980).
- [5] De Duve, C., T. De Barsey, B. Poole, A. Trouet, P. Tulkens, F. Van Hoof: Commentary: Lysosomotropic agents. *Biochem. Pharmacol.* **23**, 2495-2531 (1974).
- [6] Diribe, C. O., D. C. Warhurst: A study of the uptake of chloroquine in malaria infected erythrocytes. High and low affinity uptake and the influence of glucose and its analogues. *Biochem. Pharmacol.* **34**, 3019-3027 (1985).
- [7] Fitch, C. D.: Chloroquine resistance in malaria: A deficiency in chloroquine binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **64**, 1181-1187 (1969).
- [8] Galfre, G., S. C. Howe, C. Milstein, G. W. Bulcher, J. C. Howard: Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. *Nature* **266**, 550-552 (1977).
- [9] Gonzalès-Noriega, A., J. H. Grubb, V. Talkad, W. S. Sly: Chloroquine inhibits lysosomal enzyme pinocytosis and enhances lysosomal secretion by impairing receptor recycling. *J. Cell. Biol.* **85**, 839-852 (1980).
- [10] Griffiths, G., R. Brands, B. Burke, D. Louvard, G. Warren: Viral membrane proteins acquire galactose in trans Golgi cisternae during intracellular transport. *J. Cell. Biol.* **95**, 78 (1982).
- [11] Homewood, C. A., D. C. Warhurst, W. Peters, V. C. Baggaley: Lysosomes pH, and the antimalarial action of chloroquine. *Nature* **235**, 50-52 (1972).
- [12] Macomber, P. B., R. L. O'Brien, F. E. Hahn: Chloroquine: physiological basis of drug resistance in *P. berghei*. *Science* **152**, 1374-1375 (1966).
- [13] Moreau, S., B. Perly, C. Chachaty, C. Deleuze: A nuclear magnetic resonance study of the interactions of antimalarial drugs with porphyrins. *Biochim. Biophys. Acta* **840**, 107-116 (1985).
- [14] Peters, W.: History and current status of drugs resistance. In: W. Peters, W. H. G. Richards (eds.): *Antimalarial drugs I*. p. 432. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo 1984.
- [15] Slomianny, C., P. Charet, G. Prensier: Ultrastructural localization of enzymes involved in the feeding process in *P. chabaudi* and *Babesia hylomysci*. *J. Protozool.* **30**, 376-382 (1983).
- [16] Slomianny, C., G. Prensier, P. Charet: Ingestion of erythrocytic stroma by *Plasmodium chabaudi* trophozoites: ultrastructural study by serial sectioning and 3-dimensional reconstruction. *Parasitology* **90**, 579-588 (1985).
- [17] Slomianny, C., G. Prensier, P. Charet: Etude ultrastructurale comparée du processus de dégradation de l'hémoglobine par *P. berghei* (Vincke et Lips, 1948) en fonction de l'état de maturité de la cellule hôte. *J. Protozool.* **32**, 1-5 (1985).
- [18] Slot, J. W., J. J. Geuze: A new method of preparing gold probes for multiple-labeling cytochemistry. *Eur. J. Cell Biol.* **38**, 87-93 (1985).
- [19] Tokuyasu, K. T. J.: Present state of immunocytochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* **31**, 164-167 (1983).
- [20] Warhurst, D. C., D. J. Hockley: Mode of action of chloroquine on *P. berghei* and *P. cynomolgi*. *Nature* **214**, 935-936 (1967).
- [21] Warhurst, D. C., B. L. Robinson: Cytotoxic agents and haemozoin pigment in malaria parasites (*Plasmodium berghei*). *Life Sciences* **10**, 755-760 (1971).
- [22] Yayon, A., Z. I. Cabantchik, H. Ginsburg: Identification of the acidic compartment of *Plasmodium falciparum* infected human erythrocytes as the target of the antimalarial drug chloroquine. *EMBO J.* **3**, 2695-2700 (1984).

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - AIKAWA M.,
High-Resolution autoradiography of malarial parasites treated with ^3H -chloroquine.
Am. J. Path., 67, 277-284, 1972.

- 2 - AIKAWA M., et THOMPSON P.E.,
Localization of acid phosphatase activity in P.berghei and P.gallinaceum : an electron microscopic observation.
J. parasit., 3, 603-610, 1971.

- 3 - AISSI E., CHARET P., BOUQUELET S., et BIGUET J.,
Endoprotease in Plasmodium yoelii nigeriensis.
Comp. Biochem. Physiol., 74B, 559-566, 1983.

- 4 - ANDERSON R.G.W., FALCK J.R., GOLDSTEIN J.L., et BROWN M.S.,
Visualization of acidic organelles in intact cells by electron microscopy.
Proc. Natl. Acad. Sci : USA, 81, 4838-4842, 1984.

- 5 - BANYAL H.S., et FITCH C.D.,
Ferriprotoporphyrin IX binding substances and the mode of action of chloroquine against malaria.
Life Sciences, 31, 1141-1144, 1982.

- 6 - BASS G.E., HUDSON D.R., PARKER J.E., PURCELL W.P.,
Mechanism of antimalarial activity of chloroquine analogs from quantitative structure activities studies. Free energy related model.
J. Med. Chem., 14, 275-282, 1971.

7 - BELLAMY N. et BROOKS P.M.,

Current practice in antimalarial drug prescribing in rheumatoid arthritis.

J. Rheumatol., 13, 551-555, 1986.

8 - BOCK E., OESTERLIN M.,

Veber einige fluoresznmikroskopische beobachtungen.

Zbl. Bakt. I. Abt. orig., 143, 306-318, 1938-1939.

9 - BOLTE J.,

Thèse sur le mode d'action de composés antimalariaux. Réalisation et étude de modèles du complexe chloroquine-ADN.

Université de Clermont, Docteur ès sciences physiques, 26 Mai 1975.

10 - CHOU A.C., CHEVLI R., et FITCH C.D.,

Ferriprotoporphyrin IX fulfills the criteria for identification as the chloroquine receptor of malaria parasites.

Biochemistry, 19, 1543-1549, 1980.

11 - CHOU A.C., et FITCH C.D.

Hemolysis of mouse erythrocytes by ferriprotoporphyrin IX and chloroquine.

J. Clin. Invest., 66, 856-858, 1980.

12 - COHEN S.N. et YIELDING K.L.,

Spectrophotometric studies of the interaction of chloroquine with deoxyribonucleic acid.

J. Biol. Chem., 240, 3123-3131., 1965.

- 13 - D'ARCY HART P. et M.R. YOUNG,
Manipulations of the phagosome-lysosome fusion response in cultured macrophages. Enhancement of fusion by chloroquine and other amines. *Exp. Cell. Res.*, 114, 486-490, 1978.
- 14 - DAVIDSON M.W., GRIGGS Jr B.G., BOYKIN D.W., WILSON W.D.,
Mefloquine, a clinically useful quinoline methanol antimalarial which does not significantly bind to DNA. *Nature*, 254, 632-634, 1975.
- 15 - DAVIES E.E., WARHURST D.C., PETERS W.,
The chemotherapy of rodent malaria XXI. Action of quinine and WR 122455 (a9-phenanthrene methanol) on the fine structure of Plasmodium berghei in mouse blood. *Ann. Trop. Med. parasit.*, 69, 147, 1975.
- 16 - DE DUVE C., DEBARSY T., POULE B., TROUET A., TULKENS P. et VAN HOOFF F.,
Commentary : Lysosomotropic agents. *Biochem. Pharmacol.*, 23, 2495-2531, 1974.
- 17 - DIRIBE C.O., et WARHURST D.C.,
A study of the uptake of chloroquine in malaria-infected erythrocytes. High and low affinity uptake and the influence of glucose and its analogues. *Biochem. pharmacol.*, 34, 3019-3027, 1985.

- 18 - ERNSDORFER W.M. et KOUZNETSON R.L.,
Paludisme pharmacorésistant : apparition, lutte, surveillance.
Bull. Org. Mond. Santé, 58, 559-571, 1980.
- 19 - FELDMAN M.Y.,
Reactions of nucleic acids and nucleoproteins with formaldehyde progress in nucleic acid research and molecular biology.
Academic Press, New-York, 13, 1-49, 1973.
- 20 - FITCH C.D.,
Chloroquine resistance in malaria : a deficiency of chloroquine binding.
Proc. Nat. Acad. Sci., 64, 1181-1187, 1969.
- 21 - FITCH C.D.,
Chloroquine resistance in malaria. Drug binding and cross resistance patterns.
Proc. Helm. Soc. Wash., 39, 265-271, 1972.
- 22 - FITCH C.D., et CHEVLI R.,
Sequestration of the chloroquine receptor in cell-free preparations of erythrocytes infected with Plasmodium berghei.
Antimicrob. ag. chemother., 19, 589-592, 1981.
- 23 - FITCH C.D., YUNIS N.G., CHEVLI R. et GONZALEZ Y.,
High affinity accumulation of chloroquine by mouse.
J. Clin. Invest., 54, 24-33, 1974.

- 24 - FITCH C.D., et WARHURST D.C.,
The mode of action of chloroquine and related malarial schizonticides.
(debate).
Parasitology Today, 2, 329-334, 1986.
- 25 - FLEISCHMAN J.B., et EISEN H.N.,
Antigen recognition in delayed-type hypersensitivity.
Cellular immunology, 15, 312-320, 1975.
- 26 - GALFRE G., HOWE S.C., MILSTEIN C., BULCHER G.W., et HOWARD J.C.,
Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid
cell lines.
Nature, 266, 550-552, 1977.
- 27 - GEARY T.G. et JENSEN J.B.,
Lack of cross-resistance to 4-amino quinolines in chloroquine-resis-
tant Plasmodium falciparum in vitro.
J. Parasitol., 69, 97-105, 1983.
- 28 - GEFFARD M., MCRAE-DEGUEURCE A., et SOUAN M.L.,
Immunocytochemical detection of acetylcholine in the rat central
nervous system.
Science, 229, 77-79, 1985.
- 29 - GONZALEZ-NORIEGA A., GRUBB J.H., TALKAD V. et SLY S.W.,
Chloroquine inhibits lysosomal enzyme pinocytosis and enhances lyso-
somal enzyme secretion by impairing receptor recycling.
J. Cell. Biol., 85, 839-852, 1980.

- 30 - GUETTERIDGE W.E., TRIGG P.I., et BAYLEY P.M.,
Effects of chloroquine on Plasmodium knowlesi in vitro.
Parasitology, 64, 37-45, 1972.
- 31 - HAHN F.E.,
In antibiotics : mechanism of action of antimicrobial and antitumor
agents. CORCORAN J.N., HAHN F.E., ed. Spring-Verlag, West Berlin, 3,
58-78, 1975.
- 32 - HOMEWOOD C.A., WARHURST D.C., PETERS W., BAGALEY V.C.,
Lysosome pH and the antimalarials.
Nature, 235, 50-52, 1972.
- 33 - IRVIN J.L., et IRVIN E.M.
Spectrophotometric and potentiometric evaluation of apparent acid
dissociation exponents of various 4-aminoquinolines.
J. Amer. Chem. Soc., 69, 1091-99, 1947.
- 34 - JAMES D.M., et GILLES H.M.
Human antiparasitic drugs : Pharmacology and usage.
Wily John and sons. Chichester. New York. Brisbane, Toronto.
Singapore.
- 35 - KROGSTAD D.J., et SCHLESINGER P.H.,
The basis of antimalarial action : non-weak base effects of chloro-
quine on acid vesicle pH.
Ann. J. Trop. Med. Hyg., 36, 213-220, 1987.

- 36 - KROGSTAD D.J., SCHLESINGER P.H., et GLUZMAN I.Y.,
Antimalarials increase vesicle pH in Plasmodium falciparum.
J. Cell. Biol., 101, 2302-2309, 1985.
- 37 - LEVY M.R., et CHOU S.C.,
Activities and some properties of an acid proteinase from normal and
Plasmodium berghei infected red cells.
J. Parasitol., 59, 1064-1070, 1973.
- 38 - MACOMBER P.B., O'BRIEN R.L. et HAHN F.E.,
Chloroquine : physiological basis of drug resistance in P.berghei.
Science, 152, 1374-1375, 1966.
- 39 - MAURICE J. et PERRCE A.M.,
Tropical disease research : a global partnership UNDP/WORLD BANK/WHO.
Geneva, 1987.
- 40 - MOREAU S., CHARET P., et PRENSIER G.,
Affinity of antimalarial drugs for stacked haematin linked on Sepha-
rose.
Ann. Trop. Med. and Paras., 80, 1-8, 1986.
- 41 - MOREAU S., PERLY B., et BIGUET J.,
Interactions de la chloroquine avec la ferriprotoporphyrine IX.
Biochimie, 64, 1015-1025, 1982.

- 42 - O'BRIEN R.L., et HAHN F.E.,
Chloroquine structural requirements for binding to deoxy ribonucleic acid
and antimalarial activity.
Antimicrob. Agents chemother., 315, 1965.
- 43 - PARKER F.S., IRVIN J.L.,
The interaction of chloroquine with nucleic acid and nucleoproteins.
J. Biol. Chem., 199, 897-909, 1952.
- 44 - PETERS W., HOWELLS R.E., PORTUS J., ROBINSON B.L., THOMAS S., et
WARHURST D.C.,
The chemotherapy of rodent malaria XXVII. Studies on mefloquine (WR
142, 498).
Ann. Trop. Med. parasit., 71, 407-418, 1977.
- 45 - PETERS W., et RICHARDS W.H.G.,
Antimalarial Drugs I. Biological background, experimental methods, and
drug resistance.
Springer Verlag, Berlin Heidelberg New-York Tokyo, 68/I, 229-230,
1984.
- 46 - PINDER R.M.,
Antimalarials Med. Chem., Burger editor Wiley interscience, 1, 492-
521, 1970.



- 47 - SAINT BLANCARD J., KIRZIN J.M., RIBERON P., PETIT F., FOURCART J., GIROT P., et BOSCHETTI E.,
A simple and rapid procedure for large scale preparation of IgGs and albumin from human plasma by ion exchange and affinity chromatography. Affinity chromatography and related techniques (Gribnau T.C.J., Visser J. et Nivard R.J.F., eds), 305-312, Elsevier, Amsterdam, 1982.
- 48 - SANSONETTI P.J., LEBRAS C., VERDIER F., CHARMOT G., DUPONT B., et al.
Chloroquine-resistant Plasmodium falciparum in Cameroon.
Lancet 1 : 1154-1155, 1985.
- 49 - SCHUELER F.W., et CANTRELL W.F.,
Antagonism of the antimalarial action of chloroquine by ferritinate and an hypothesis for the mechanism of chloroquine resistance.
J. Pharmacol. Exp. Therap., 143n 278-281, 1963.
- 50 - SLOMIANNY C.,
Thèse sur l'action de la chloroquine sur le processus de dégradation de l'hémoglobine chez Plasmodium sp.
Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres Artois, en mai 1986.
- 51 - SLOMIANNY C., CHARET P., PRENSIER G.,
Ultrastructural localization of enzymes involved in the feeding process in P.chabaudi and Babesia hylomysci.
J. Protozool., 30, 376-388, 1983.

- 52 - SLOMIANNY C., PRENSIER G., et CHARET P.,
Relation between Haemoglobin degradation and maturity of the red blood cell infected by P.berghei.
Comp. Biochem. Physiol., 78 B, 891-896, 1984.
- 53 - SLOMIANNY C., PRENSIER G., CHARET P.,
Etude ultrastructurale comparée du processus de dégradation de l'hémoglobine par P.berghei (Vincke et Lips, 1948) en fonction de l'état de maturité de la cellule hôte.
J. Protozool., 32, 1-5, 1985.
- 54 - SLOMIANNY C., PRENSIER G., et CHARET P.,
Ingestion of erythrocytic stroma by Plasmodium chabaudi trophozoïtes : ultrastructural study by serial sectioning and 3-dimensional reconstruction.
Parasitology, 90, 579-588, 1985.
- 55 - SLOT J.W., GUEUZE J.J.,
A new method of preparing gold probes for multiple-labeling cytochemistry.
Eur. J. Cell. Biol., 38, 87-93, 1985.
- 56 - TABOR C.W., TABOR H., et BACHRACH V.,
Identification of the aminoaldehydes produced by the oxidation of spermine and spermidine with purified plasma amine oxidase.
The Journal of biological chemistry, 239, 2194-2203, 1964.

- 57 - VAITUKAITIS J., ROBBINS J.B., NIESCHLAGE, et ROSS G.T.,
A method for producing specific antisera with small doses of immunogen;
J. Clin. Endocr., 33, 888-891, 1971.
- 58 - WARHURST D.C.,
The quinine-haemin interaction and its relationship to antimalarial activity.
Biochem. pharmacol., 30, 3323-3327, 1981.
- 59 - WARHURST D.C. et GOULD S.,
The chemotherapy of rodent malaria XXXIII. The activity of chloroquine and related blood schizonticides and of some analogues in drug induced pigment clumping.
Ann. of Trop. Med. Parasitol., 76, 257-264, 1982.
- 60 - WARHURST D.C., et ROBINSON B.L.,
Cytotoxic agents and Hemozoïn pigment in malaria parasites (Plasmodium berghei).
Life Sciences, 10, 755-760, 1971.
- 61 - WARHURST D.C., THOMAS S.C.,
Pharmacology of the malaria parasite, a study of dose-response relationships in chloroquine induced autophagic vacuole formation in Plasmodium berghei.
Biochem. Pharmacol., 24, 2047-2056, 1975.

- 62 - WERY M., et COOSEMANS M.,
La résistance médicamenteuse dans le paludisme.
Annales de la Société belge de Médecine tropicale, 60, 139-140, 1980.
- 63 - YAYON A., CABANTCHIK Z.I., et GINSBURG H.,
Identification of the acidic compartment of Plasmodium falciparum
infected human erythrocytes as target of the antimalarial drug chlo-
roquine.
The EMBO Journal, 3, 11, 2695-2700, 1984.
- 64 - YAYON A., CABANTCHIK Z.I., et GINSBURG H.,
Susceptibility of human malaria parasites to chloroquine is pH depen-
dent.
Proc. natl. Acad. Sci. USA, 82, 2784-2788, 1985.
- 65 - YAYON A., GINSBURG H.,
Chloroquine inhibits the degradation of endocytic vesicles in human
malaria parasites.
Cell Biology International Reports, 7, 895, 1983.
- 66 - YAYON A., TIMBERG R., FRIEDMAN S., et GINSBURG H.,
Effects of chloroquine on the feeding mechanism of the intraerythro-
cytic human malarial parasite Plasmodium falciparum.
J. Protozool., 31, 367-372, 1984.

PLANCHE I

Plasmodium berghei N. Localisation de la sonde CQA.

Vue n° 1 - Trophozoïte. Témoin sans traitement à la sonde CQA.

X 32 100.

Vue n° 2 - Trophozoïte. Noter la présence de marquage au niveau des vacuoles pigmentaires (VP) et des vacuoles non pigmentaires (VNP).

X 38 500.

Vue n° 3 - Trophozoïte moyen. Vue de détail des vacuoles pigmentaires marquées et de la vacuole en formation (VF) non marquée.

X 20 700.

Vue n° 4 - Trophozoïtes moyens. Le marquage est concentré dans les vacuoles pigmentaires et non pigmentaires. La vacuole en formation est exempte de marquage.

X 31 200.

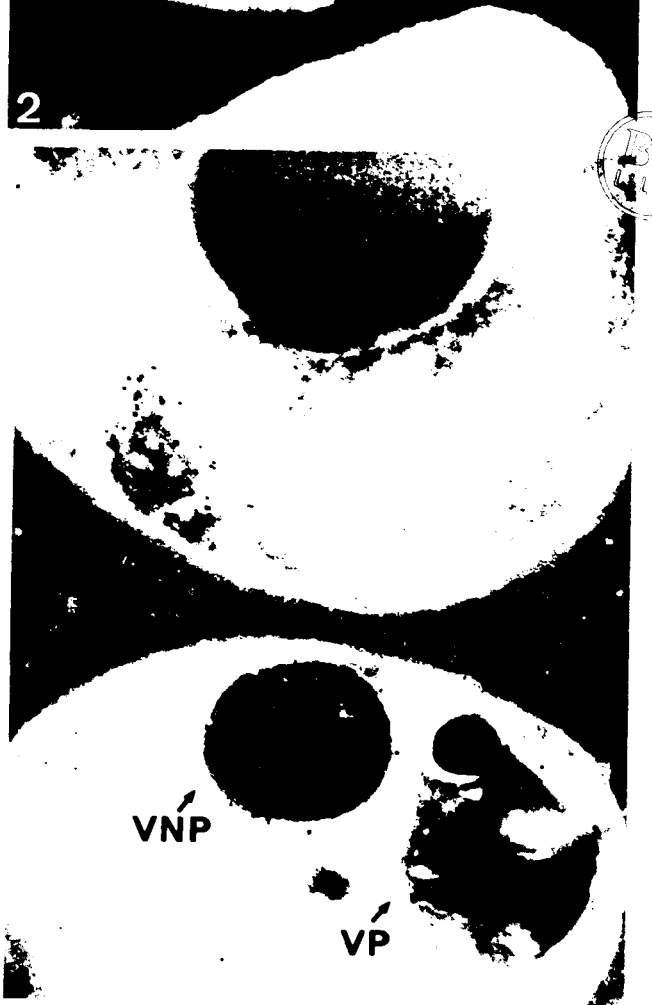
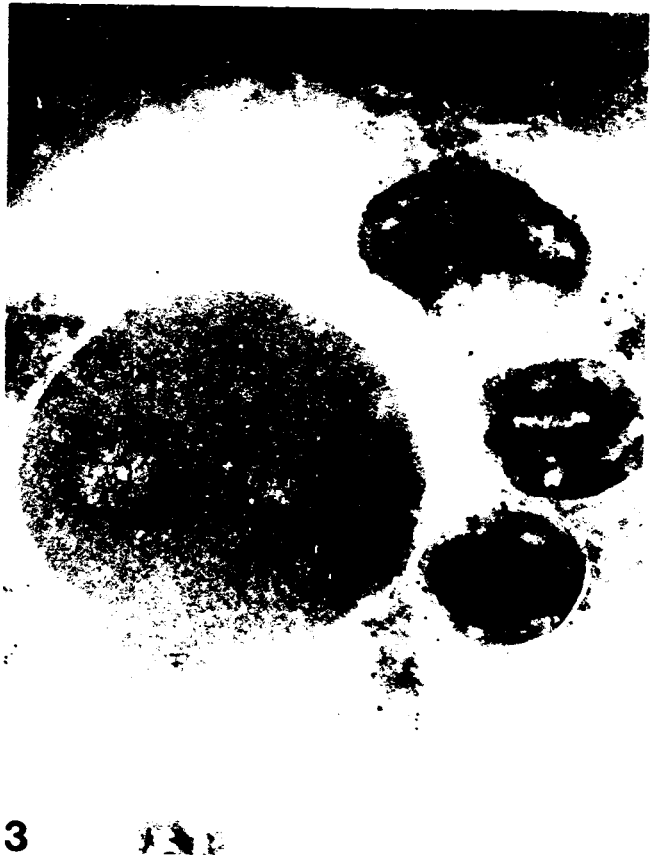
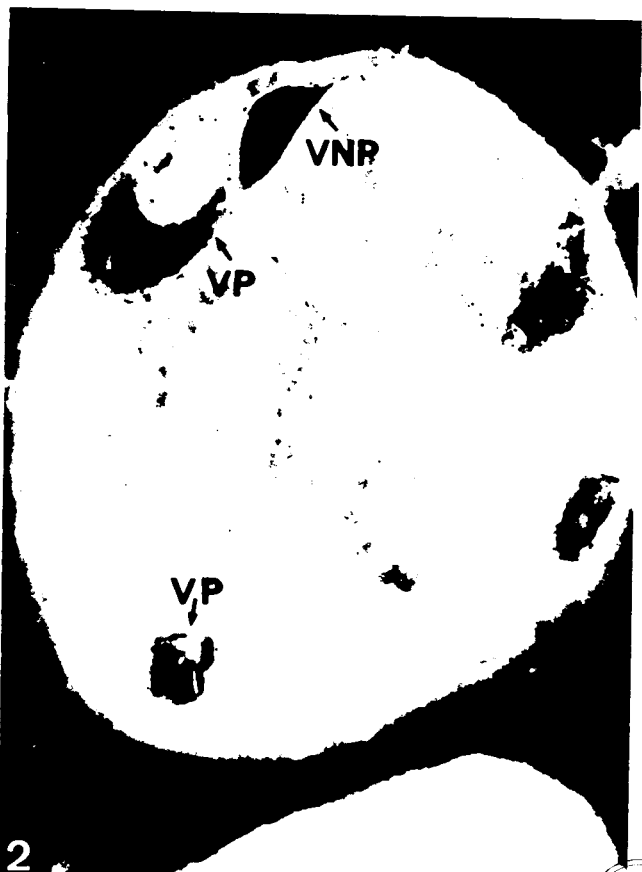


PLANCHE II

P.berghei N. Localisation de la sonde CQA.

Vue n° 1 : Ce trophozoïte présente une concentration de marqueur au niveau de la vacuole autophage (VA) contenant des fragments de cytoplasme parasitaire (CP) ainsi que des vésicules d'endocytose non pigmentaires (VENP).

X 42 350.

Vue n° 2 : La vacuole autophage de ce trophozoïte contient des vésicules d'endocytose pigmentaires (VEP).

X 15 600.

Vue n° 3 : Schizonte âgé dont la vacuole résiduelle (VR) concentre la sonde CQA.

X 35 300.

Vue n° 4 : Le noyau (N) ainsi que la vacuole en formation (VF) sont exempts de marquage.

X 54 000.

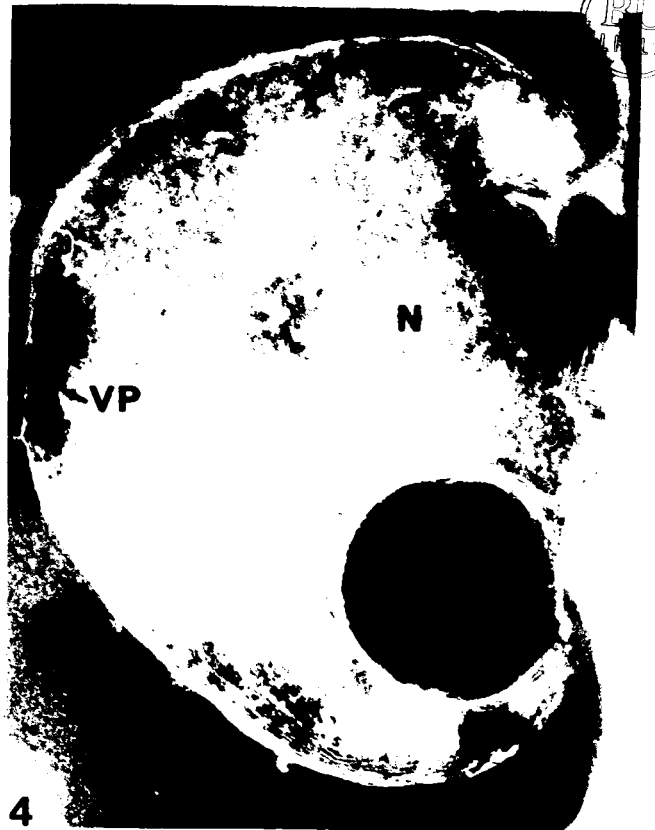


PLANCHE III

P. berghei N. Cinétique d'incorporation de la sonde CQA

Vue n° 1 : Après 2 minutes de traitement, seul le cytoplasme de la cellule hôte est marqué (pointes de flèche).

X 33 300.

Vue n° 2 : A 10 minutes de traitement, les vacuoles pigmentaires dispersées dans le cytoplasme parasitaire sont marquées.

X 40 700.

Vue n° 3 : Les vacuoles d'endocytose marquées commencent à se rassembler et fusionnent au bout de 30 minutes de traitement.

X 36 000.

Vue n° 4 : A partir d'une heure, on n'observe que deux ou trois grosses vacuoles digestives marquées.

X 42 700.

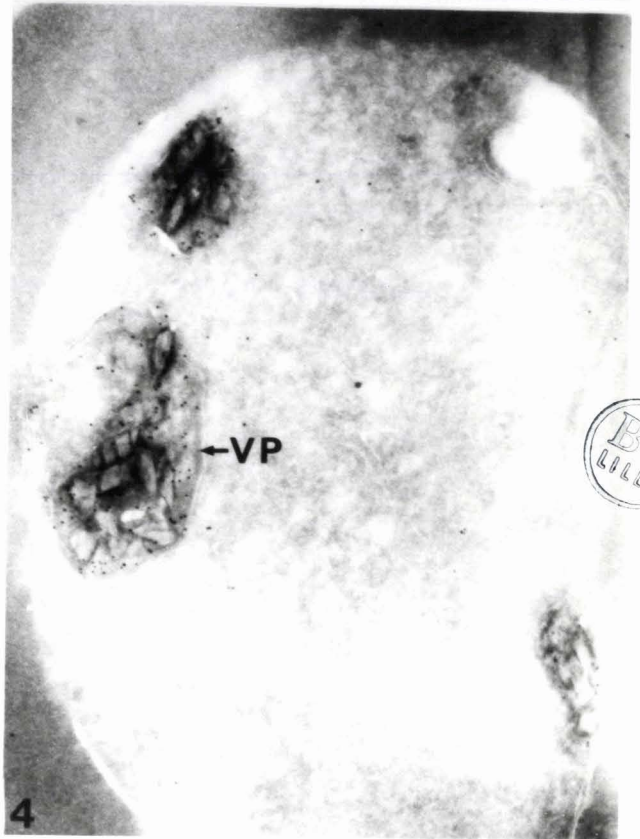
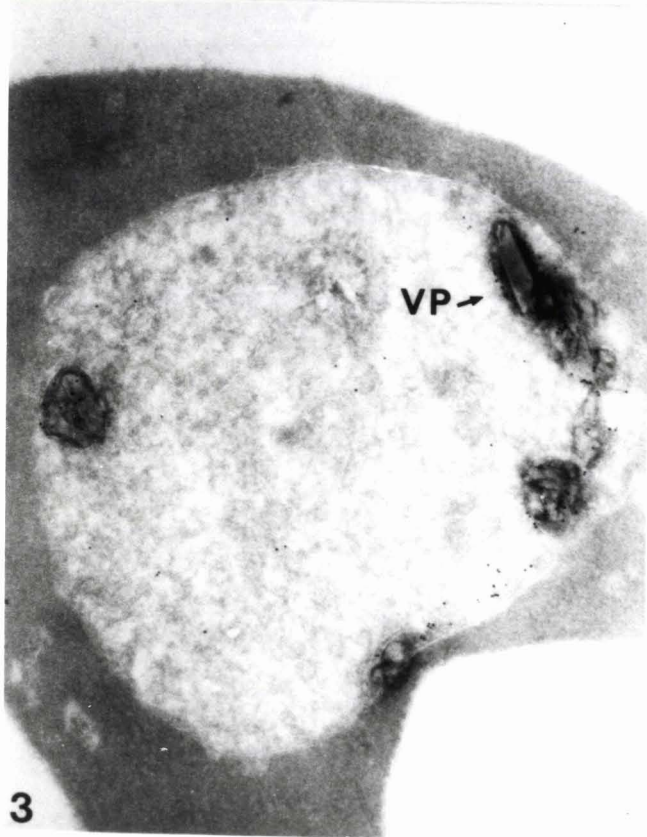
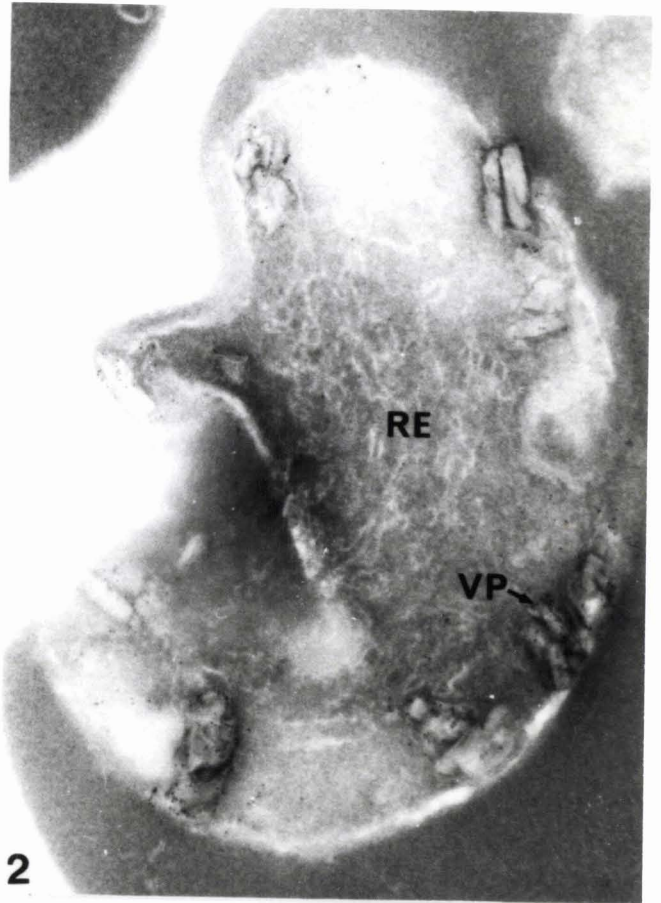
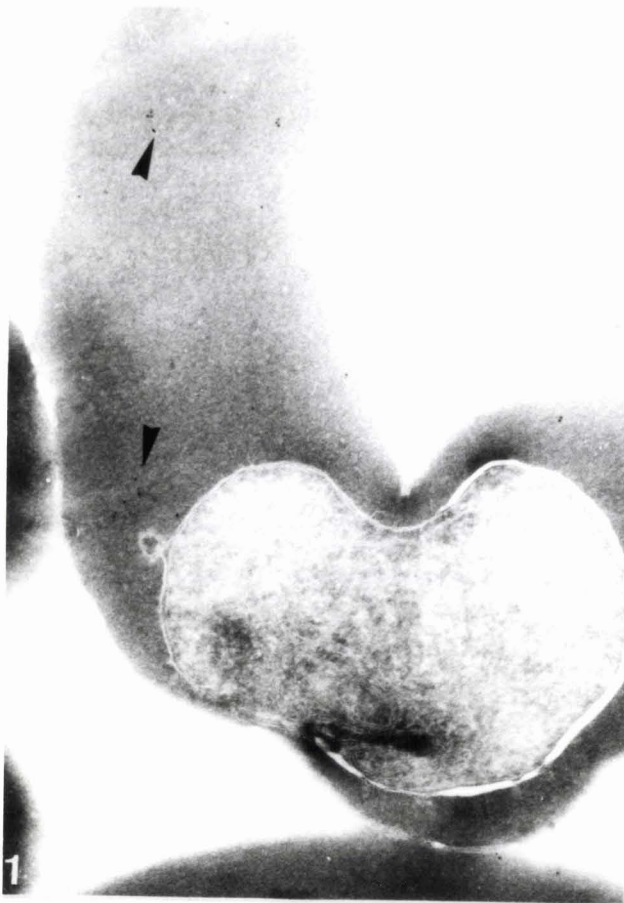


PLANCHE IV

Trophozoïtes de P. berghei RC. Localisation de la sonde CQA.

Vue n° 1 : Les grains d'or sont répartis sur l'ensemble du cytoplasme parasitaire sans marquage préférentiel des vacuoles pigmentaires (VP) ou non pigmentaires (VNP).

X 39 000.

Vue n° 2 : Les vacuoles en formation le cytoplasme de la cellule hôte ne présentent pas de marquage (VF).

X 21 300.

Vue n° 3 : Le noyau est exempt de marquage.

X 13 400.

Vue n° 4 : Nous n'observons pas de marquage préférentiel des vacuoles digestives pigmentaires (VP).

X 45 700.



1



3



4

PLANCHE V

Localisation de la sonde CQA

Vue n° 1 : Le granulocyte neutrophile ne montre pas de marquage au niveau de ses granulations (Gr), et du cytoplasme.

X 16 800.

Vue n° 2 : Le monocyte est exempt de marquage au niveau du cytoplasme, du noyau, des mitochondries (M), et de l'appareil de golgi (G).

X 14 300.

Vue n° 3 : Le trophozoïte moyen de P.berghei RC présente une vacuole pigmentaire concentrant la souche CQA.

X 44 500.

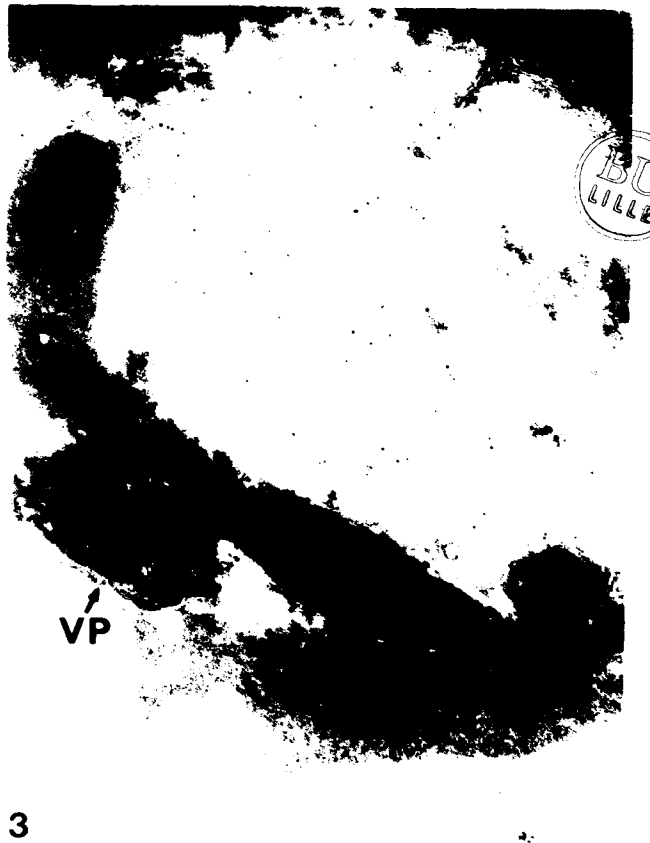


PLANCHE VI

P.berghei N. Localisation de la sonde DAMP

Vue n° 1 : La sonde DAMP se concentre dans les vacuoles pigmentaires (VP).
Le cytoplasme parasitaire et la cellule hôte sont exempts de marquage.

X 34 300.

Vue n° 2 : Le trophozoïte concentre le DAMP dans les vacuoles pigmentaires (VP) et non pigmentaires (VNP).

Les vacuoles en formation (VF) ne retiennent pas le marquage.

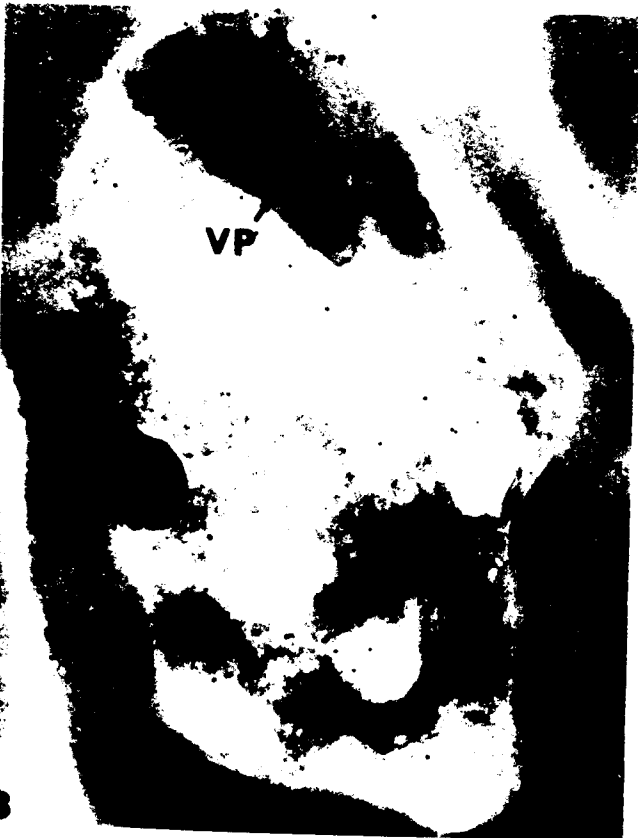
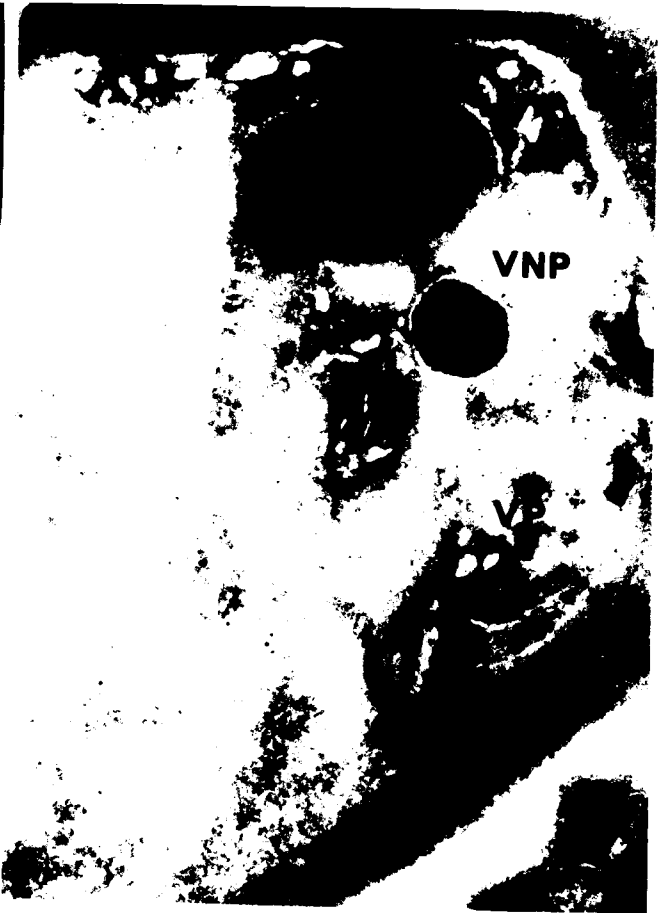
X 47 700.

Vue n° 3 : Seules les vacuoles digestives pigmentaires (VP) sont marquées chez ce trophozoïte.

X 50 500.

Vue n° 4 : Le noyau (N) et les vacuoles en formation (VF) ne présentent pas de marquage.

X 40 400.



BU
LILLE

PLANCHE VII

P.berghei RC. Localisation de la sonde DAMP

Vue n° 1 : L'ensemble du cytoplasme parasite présente du marquage sans préférence pour les vésicules de pinocytose (pointe de flèche). Les vacuoles pigmentaires (VP) plus importantes concentrent ce marqueur.

X 59 200.

Vue n° 2 : Les vacuoles pigmentaires (VP) ainsi que les vacuoles non pigmentaires (VNP) concentrent le DAMP.

X 53 300.

Vue n° 3 : Le noyau ne montre pas de marquage tandis que le cytoplasme de la cellule hôte présente un marquage diffus (pointe de flèche).

X 16 900.

Vue n° 4 : Seules les vacuoles en formation (VF) sont exemptes de marquage.

X 34 500.

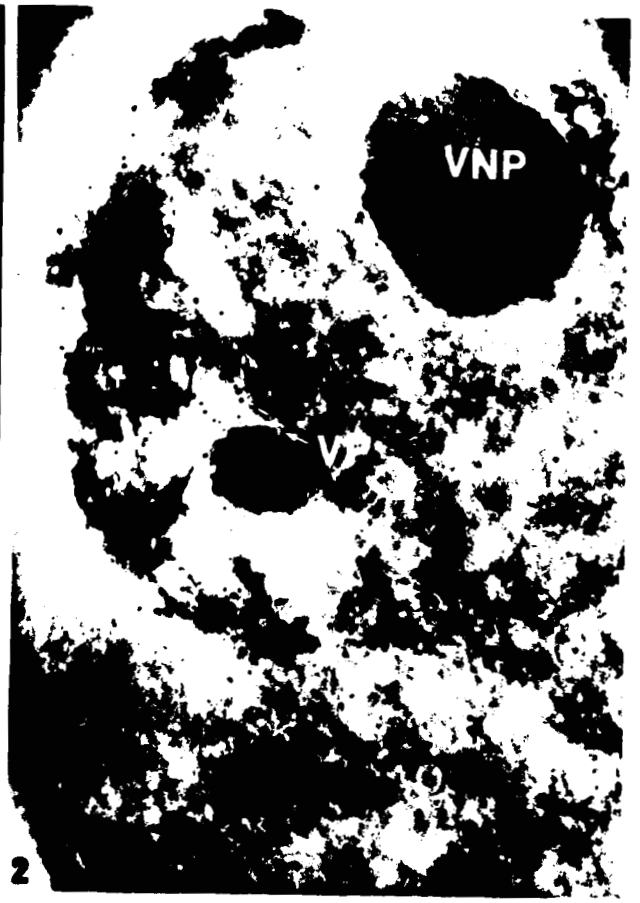


PLANCHE VIII

**Trophozoïtes de P.berghei N. Localisation de la sonde CQA, 30 minutes
après traitement (100 mg:kg)**

Vue n° 1 : Concentration de la sonde DAMP dans les phagolysosomes (PH) des granulocytes neutrophiles. Le cytoplasme ainsi que le noyau (N) ne présentent pas de marquage.

X 21 200.

Vue n° 2 : Les phagolysosomes (PH) ainsi que les granulations éosinophiles (GE) des cellules polynucléaires éosinophiles concentrent notablement la sonde DAMP. Le cytoplasme et le noyau (N) ne montrent pas de marquage.

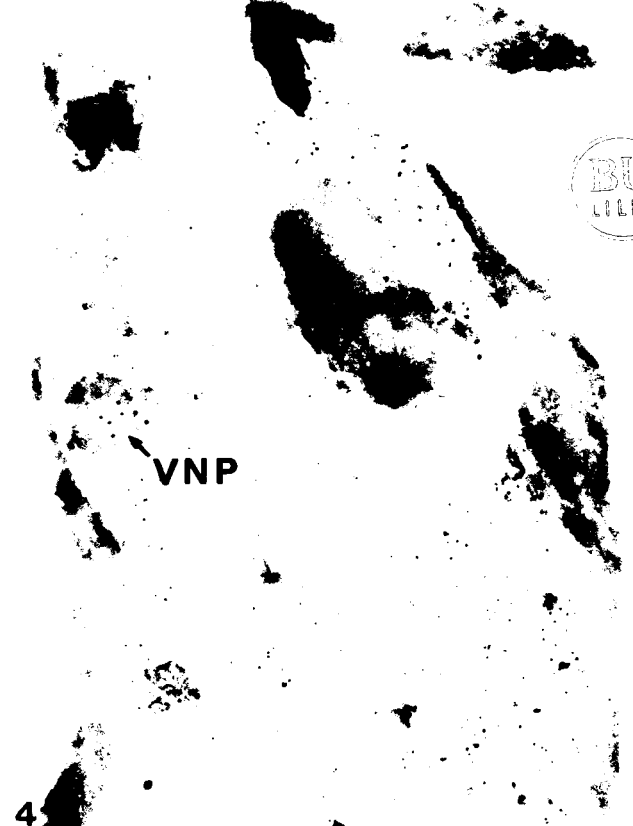
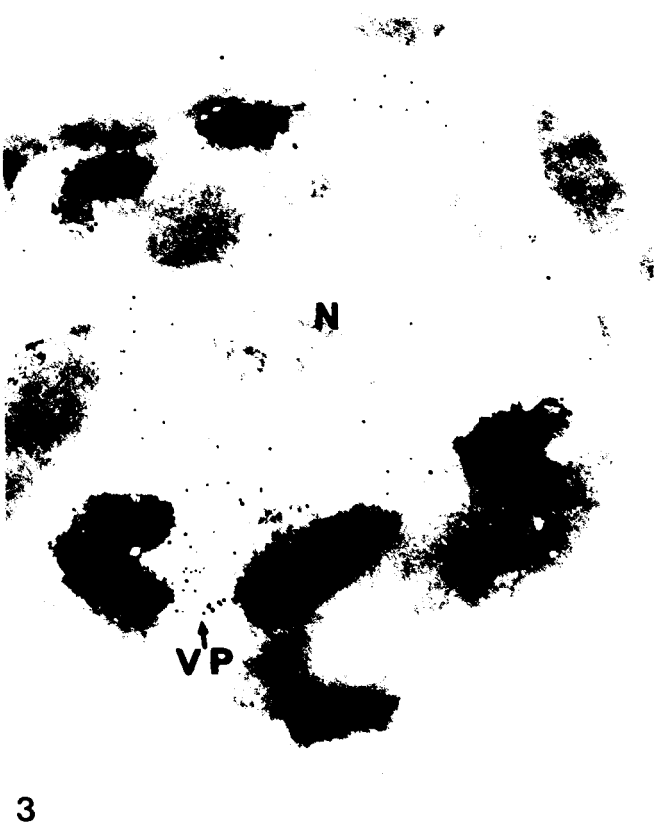
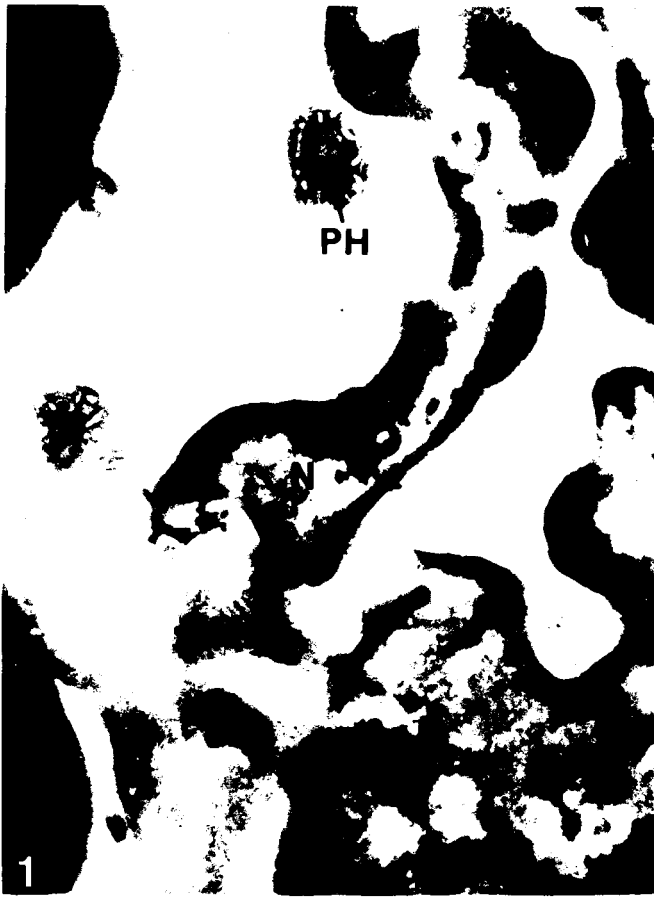
X 43 400.

Vue n° 3 : Le marquage est réparti sur l'ensemble du cytoplasme parasitaire. Les vacuoles pigmentaires (VP) sont également marquées . Le noyau (N) ainsi que le cytoplasme de la cellule hôte ne présentent pas de marquage.

X 56 800.

Vue n° 4 : Les vacuoles non pigmentaires (VNP) et le cytoplasme parasitaire concentrent la sonde CQA. La vacuole en formation (VF) ne concentre pas la sonde.

X 37 500.



BU
LILLE

RESUME

Le mode d'action de la chloroquine, principal médicament antimalarique actuellement utilisé, a été abordé au niveau d'une étape clé de son mécanisme : la concentration intraparasitaire.

L'immunodétection ultrastructurale de deux sondes moléculaires :

- une amino-4-quinoléine, analogue de la chloroquine
- une base faible comportant un noyau dinitroaromatique

sur des coupes ultrafines à congélation de Plasmodium berghei ont permis, de préciser les sites de concentration de la chloroquine d'une part, et de localiser les compartiments acides parasitaires d'autre part.

Il a été montré que chez une souche de Plasmodium sensible à la chloroquine (P.berghei N), les vacuoles digestives du parasite, sièges de la dégradation de l'hémoglobine constituent le site de concentration de la chloroquine et qu'elles constituent également des compartiments acides pour le parasite.

Dans le cas d'une souche de P.berghei résistante à la chloroquine (P.berhei RC), le cytoplasme parasitaire concentre de manière importante les amino-4-quinoléïnes et présente en même temps un caractère acide.

Un mécanisme de résistance peut être proposé : Les vacuoles digestives du parasite ne présentent plus la capacité à concentrer la chloroquine, celle-ci est retenue dans le cytoplasme parasitaire. Ce phénomène semble lié à un défaut d'acidification de ces mêmes vacuoles et une acidification concomitante du cytoplasme.