

50376
1990
235

50376
1990
235

Ce travail a été effectué 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).



Je dédie cette thèse

A mes parents, ma famille, ma grand-mère, Jean-Noël...

A Laurence et ses proches,

A tous mes amis.

Je remercie Monsieur le professeur D. Camus pour l'accueil qu'il m'a réservé au sein de son laboratoire et pour avoir accepté la présidence de cette thèse.

Je tiens tout particulièrement à remercier Monsieur le professeur P. Charet d'avoir accepté d'être le rapporteur de cette thèse et aussi de m'avoir permis de découvrir le monde de l'enseignement. Qu'il trouve ici, l'expression de ma reconnaissance.

Je remercie Monsieur le professeur P. Courtoy d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse.

Je remercie Monsieur le professeur P. Formstecher d'avoir bien voulu s'intéresser à cette thèse en acceptant de la juger.

Je voudrais également exprimer toute ma reconnaissance à Monsieur S. Moreau qui a assuré la direction scientifique de ce travail. Il a su me faire bénéficier de son expérience et par sa rigueur scientifique et son esprit critique m'a permis de mener à bien ce travail.

Je remercie Monsieur le professeur G. Prensier d'avoir accepté d'examiner ce travail et de m'avoir donné de précieux conseils au début de ma recherche.

Je remercie tous les membres de l'unité 42 pour leur aide et leurs conseils.

Je remercie tout particulièrement Madame Annick Masset pour son aide précieuse et efficace pendant ce travail. Je témoigne ma sympathie à Madame Anne Engels pour sa gentillesse lors de mes intrusions dans la partie chimie du laboratoire.

Table des matières

I)-INTRODUCTION	9
II)-GENERALITES.	10
A)-IMPORTANCE DU PALUDISME	11
B)-BIOLOGIE DU PLASMODIUM Sp.	11
1)-Le cycle biologique.	11
a)-Chez le vertébré	11
*)-Première étape : La schizogonie hépatique.	12
*)-Seconde étape : la schizogonie intraérythrocytaire	12
b)-Chez l'anophèle femelle.	13
2)-Dégradation de l'hémoglobine.	13
C)-CHIMIOThERAPIE	15
1)-Définition et historique.	15
2)-Résistance aux antimalariques.	15
3)-Les antimalariques.	16
a)-Les antimétabolites.	16
b)-Les amino-8-quinoléines.	18
c)-Les schizonticides sanguins.	18
D)-SCHIZONTICIDES SANGUINS.	20
1)-Introduction.	20
2)-Structure chimique.	20
a)-Les molécules de type chloroquine.	20
b)- Les molécules de type quinine.	21
3)-Relations structure-activité.	22
a)-La chloroquine.	22
*)-Modification du noyau quinoléique.	22
*)-Modification de la chaîne latérale.	22
b)-La quinine.	23
*)-Noyau quinoléique.	23
*)-Modification de la chaîne latérale.	23
4)-Les propriétés biologiques.	24
a)-concentration intraparasitaire de la chloroquine.	24
b)-Coalescence du pigment malarique.	24
c)-Conclusion.	25
5)-Mode d'action des schizonticides sanguins.	26
a)-Interaction avec ADN parasitaire.	26
b)-Interaction chloroquine ferriprotoporphyrine IX.	27
c)-Concentration intralysosomiale.	29
E)-CONCENTRATION INTRALYSOSOMALE DE LA CHLOROQUINE.	32
1)-Existence d'un compartiment acide.	33
2)-Vacuole digestive.	34
3)-Mécanisme lysosomotrope.	34
4)-Synthèse	35
III)-RESULTATS	37
A)-DETERMINATION DES COMPARTIMENTS ACIDES CHEZ <u>P.berghei</u>	38
1)-Structure et intérêt de la monensine	38
2)-localisation des compartiments acides chez <u>P.berghei</u>	39
a)-Résultats	40
3)-Discussion	40
B)-ROLE DES PROPRIETES DE BASE FAIBLE DE LA CHLOROQUINE DANS SON MECANISME	42
1)-Détermination du site de rétention de la 7-H chloroquine.	43
a)-Synthèse de la sonde QA	43
c)-Propriétés biologiques	44
*)-Le test des quatre jours.	45
*)-Le test de coalescence du pigment malarique.	46
d)-obtention d'anticorps polyclonaux.	46
*)-Synthèse de l'antigène SAB-QA	47
*)-Obtention des anticorps polyclonaux.	47
*)-Rétention de la sonde QA	47

e)-Localisation intraparasitaire de la sonde QA.	48
*)-P.berghei N	48
*)-P.berghei RC	49
2)-Détermination des quantités de sondes accumulées chez P.berghei	49
a)-Mesure de la constante d'affinité du complexe CLQ-P.berghei	49
b)-mesure des constantes d'inhibition.	51
*)-Calcul de la constante d'inhibition.	52
c)-conclusion	55
C)-ANALYSE CINETIQUE	57
1)-Introduction	57
2)-Définition d'une cinétique	58
3)-Mesure de la vitesse initiale d'incorporation du DAMP dans l'hématie	61
a)-Synthèse du DAMP radioactif	61
b)-Cinétique de concentration du DAMP sur hématie saine et parasitée	61
c)-Cinétique de concentration de la chloroquine sur hématie saines et parasitée	64
d)-Essais d'inhibition de la vitesse initiale	66
e)-Relation entre pH externe et vitesse initiale	69
IV)-DISCUSSION	71
V)-CONCLUSION	76
VI)-MATÉRIELS ET MÉTHODES	79
A)-Matériel	80
1)-Modèle expérimental : la souris	80
2)-Souches	80
*)-P.berghei N	80
*)-P.berghei RC	80
*)-P.Yoelii nigerensis	80
c)-Entretien des souches et infestation	81
d)-Cryopréservation	81
3)-Hématologie	81
a)-Frottis sanguin	81
b)-Parasitémie	82
c)-Détermination du volume globulaire moyen	82
d)-Test des quatre jours	82
e)-Test de coalescence du pigment malarique	83
B)-Microscopie électronique à congélation	83
1)-Préparation de l'échantillon	83
a)-Fixation	83
b)-Imprégnation	84
c)-Congélation	84
2)-Coupes	84
3)-Immunodétection	84
C)-Microscopie électronique classique	85
D)-Synthèses chimiques	86
1)-Synthèse de l'analogue de la chloroquine sans chlore	86
a)-Monoacétyldiaminobutane	86
b)-4-phénoxyquinoléine	86
*)-Réaction	86
*)-Extraction	86
c)-(Acétylamino-4-butylamino)-4quinoléine	86
d)-(Amino-4-butylamino)-4-quinoléine	87
2)-Synthèse du DAMP radioactif	87
D)-PRODUCTION D'ANTICORPS POLYCLONAUX.	87
1)-Préparation de l'antigène QA-BSA	87
2)-Synthèse du dérivé succinylé de QA	88
3)-Greffage du dérivé succinylé de QA sur La BSA.	88

4)-Obtention des anticorps polyclonaux	88
5)-Technique E.L.I.S.A.	89
E)-Méthodes d'incubation des parasites	90
1)-Milieu pour le maintien de <u>P. berghei</u> N <i>in vitro</i>	90
2)-Méthode d'incubation pour la mesure des constantes d'affinité	90
3)-Mesure des constantes d'affinité en présence d'inhibiteurs.	91
4)- Méthodes de mesure de la vitesse initiale.	91
a)-DAMP	91
b)-Chloroquine	92
VII)-BIBLIOGRAPHIE	94
VIII)-PLANCHES	106

Introduction

La chloroquine est à l'heure actuelle le médicament le plus employé dans le traitement du paludisme. Son utilisation en chimiothérapie et en prophylaxie depuis de nombreuses années et sur une grande échelle géographique a abouti au développement de souches plasmodiales résistantes à cette drogue. Malgré la découverte de nouveaux antimalariques (Méfloquine, Halofantrine), la médecine moderne est incapable d'enrayer l'extension géographique et craint l'apparition de la résistance envers les nouveaux antimalariques. Ces problèmes ont orienté les recherches vers une meilleure compréhension de la biologie du Plasmodium et du mode d'action des antipaludiques.

Différentes hypothèses concernant le mode d'action et de concentration intraparasitaire de la chloroquine ont été proposées, mais aucune d'entre elles ne rend compte de l'ensemble des faits expérimentaux.

Le travail accompli dans cette thèse a pour objectif de cerner les caractéristiques de la chloroquine et du parasite responsables de la concentration préférentielle intraparasitaire des schizonticides sanguins.

Généralités

A)-IMPORTANCE DU PALUDISME.

Le paludisme reste malgré les efforts de la médecine moderne, le principal désastre dans le domaine de la santé des pays en voie de développement tant du point de vue humanitaire qu'économique.

L'organisation mondiale de la santé (O. M. S.) estime la morbidité du paludisme à plus de cent millions de cas par année, avec une mortalité avoisinant les deux millions.

Cette recrudescence du paludisme est d'autant plus alarmante, qu'elle s'accompagne de la dispersion et de l'extension au continent africain des souches de Plasmodium résistantes aux antimalariques.

Pour terminer ce sombre tableau du paludisme et pour souligner l'importance des recherches actuelles, n'oublions pas que la moitié de la population mondiale vit en zone endémique paludéenne.

B)-BIOLOGIE DU *PLASMODIUM* Sp.

Afin de mieux comprendre le lieu et le mode d'action des antimalariques étudiés dans ce travail, il est nécessaire de rappeler brièvement la biologie du Plasmodium.

1)-Le cycle biologique.

IL est d'un abord compliqué, se composant de trois phases successives se déroulant dans deux hôtes.

-Un vertébré : hôte intermédiaire

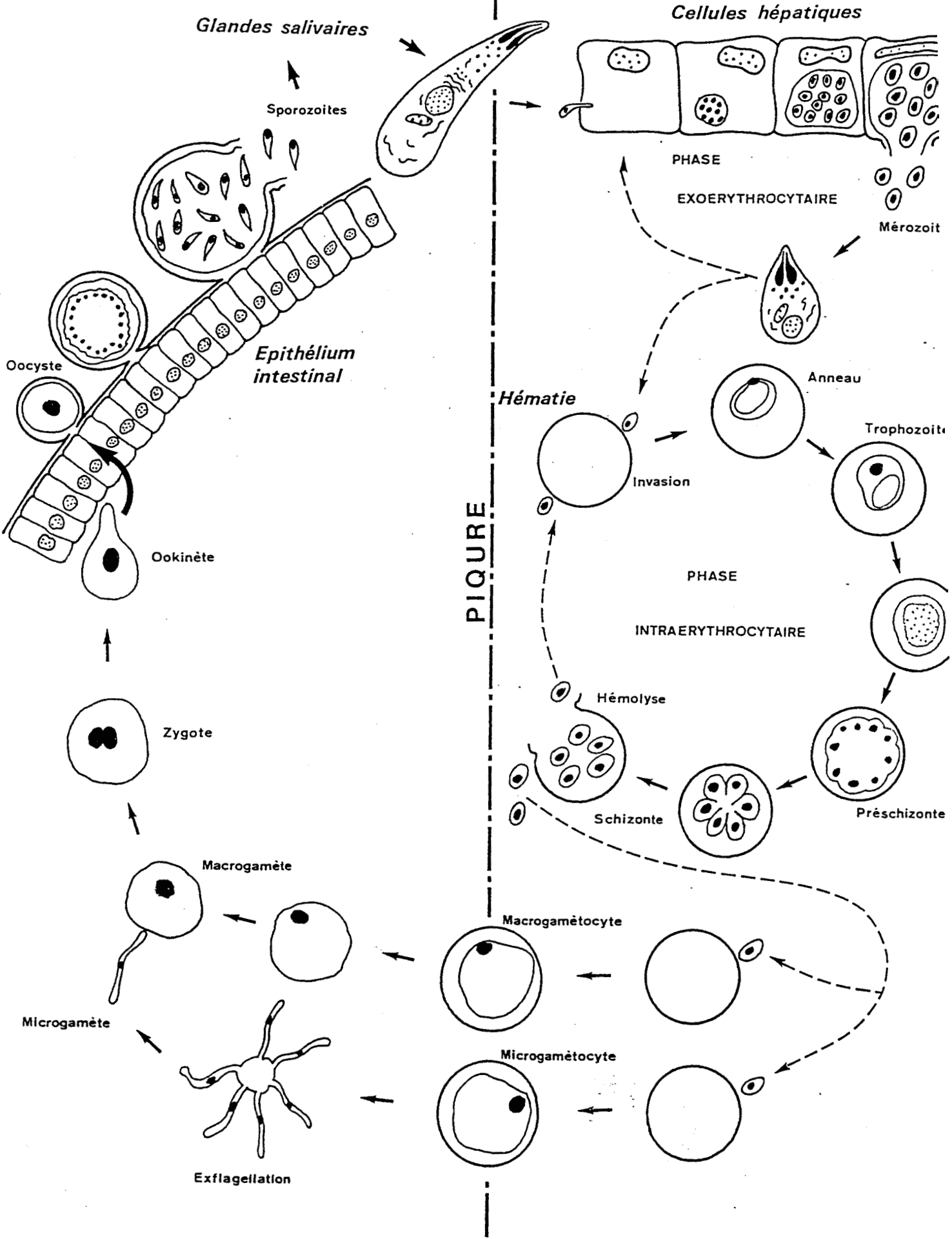
-L'anophèle : hôte définitif

a)-Chez le vertébré

Le cycle parasitaire est composé de deux étapes au niveau de l'hôte intermédiaire.

MOUSTIQUE

RONGEUR



Cycle évolutif de *Plasmodium murin*.

***)-Première étape : La schizogonie hépatique.**

Lors de son repas sanguin, l'anophèle femelle infectée et infestante régurgite, dans la circulation sanguine, des formes parasitaires infestantes : les sporozoïtes.

Grâce à leur tropisme pour le foie, les sporozoïtes disparaissent très rapidement de la circulation sanguine et pénètrent dans les hépatocytes.

Les sporozoïtes vont se multiplier de manière asexuée à l'intérieur de l'hépatozoïte (hépatocyte infesté) donnant naissance à un schizonte (corps bleu). Lorsque le schizonte hépatique atteint sa maturité, il éclate et libère des mérozoïtes. Suivant l'espèce de Plasmodium, les mérozoïtes vont pouvoir soit refaire un cycle hépatique, soit démarrer la deuxième phase du cycle chez l'homme : la schizogonie intraérythrocytaire ou prendre une forme dormante.

***)-Seconde étape : la schizogonie intraérythrocytaire.**

La majeure partie des mérozoïtes gagne donc le flot sanguin et pénètre dans les hématies.

La première figure caractéristique du développement du mérozoïte dans l'hématie correspond à l'apparition d'une forme en anneau appelée trophozoïte. Ce trophozoïte va croître en dégradant l'hémoglobine du globule rouge. Le trophozoïte va évoluer en schizonte à l'intérieur duquel se produit des divisions nucléaires conduisant à l'individualisation de mérozoïtes. Lorsque le schizonte (Corps en rosace) éclate, une partie des mérozoïtes libérés infeste des autres hématies continuant ainsi le cycle intraérythrocytaire.

Notons que les schizonticides sanguins étudiés dans ce travail agissent uniquement au niveau de cette phase du développement parasitaire.

Après plusieurs cycles intraérythrocytaires, certains mérozoïtes, après pénétration dans l'hématie évoluent en gamétocytes mâles ou femelles. Ces gamétocytes circulant de préférence dans les capillaires périphériques permettent la continuité du cycle dans l'hôte définitif : l'anophèle femelle.

b)-Chez l'anophèle femelle.

Lors de son repas sanguin, l'anophèle femelle ingère les gamétocytes. Les microgamétocytes subissent dans l'estomac du moustique une exflagellation donnant naissance aux gamètes mâles alors que les macrogamétocytes évoluent en gamètes femelles.

La fécondation aboutit à un oeuf mobile (ookinète). L'ookinète traverse la paroi stomacale, migre vers l'épithélium intestinal où il s'enkyste pour former l'oocyste.

Il se produit de nouveau une multiplication asexuée conduisant à la formation de sporozoïtes. A maturation, l'oocyste se lyse et libère les sporozoïtes. Ces derniers vont migrer vers les glandes salivaires.

Lors d'un repas, le moustique injecte dans la circulation sanguine de l'homme des sporozoïtes perpétuant ainsi le cycle parasitaire.

2)-Dégradation de l'hémoglobine.

Le développement en taille du parasite se fait au détriment du stroma érythrocytaire composé en majeure partie de l'hémoglobine.

De nombreux travaux ont démontré qu'effectivement le parasite dégrade l'hémoglobine, libérant des acides aminés dans le milieu extérieur. La dégradation de l'hémoglobine conduit à la formation du pigment malarique contenu dans les vacuoles parasitaires.

La morphologie du système vacuolaire responsable de la dégradation de l'hémoglobine peut-être résumée par le schéma suivant(1).

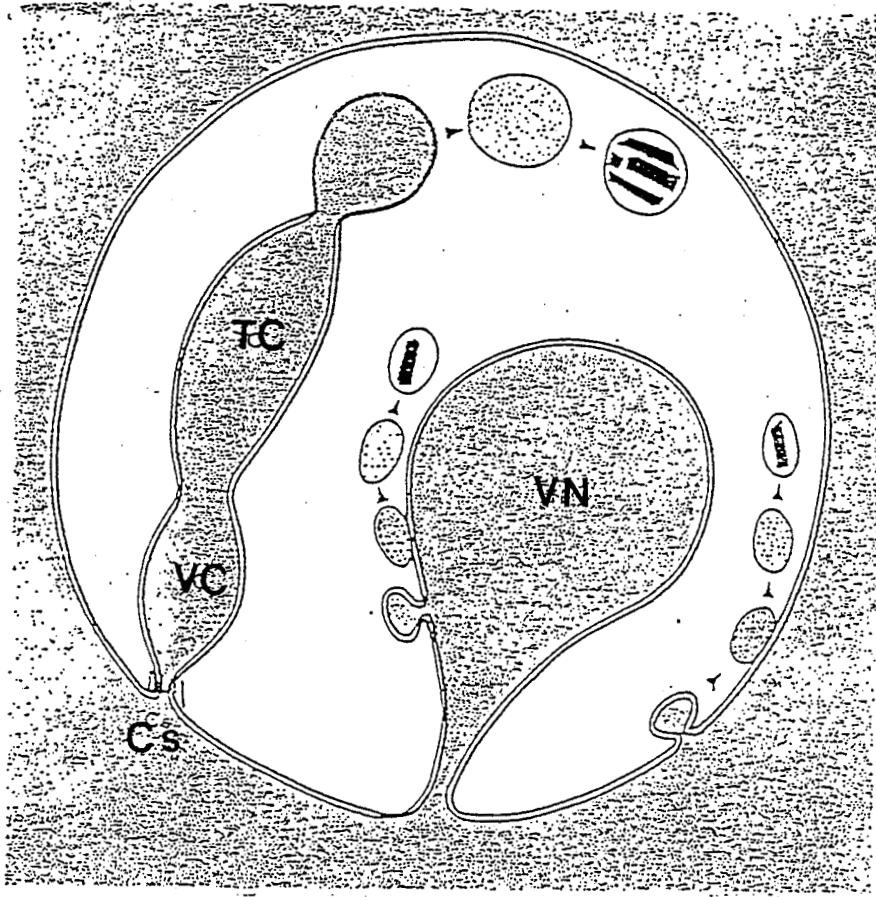


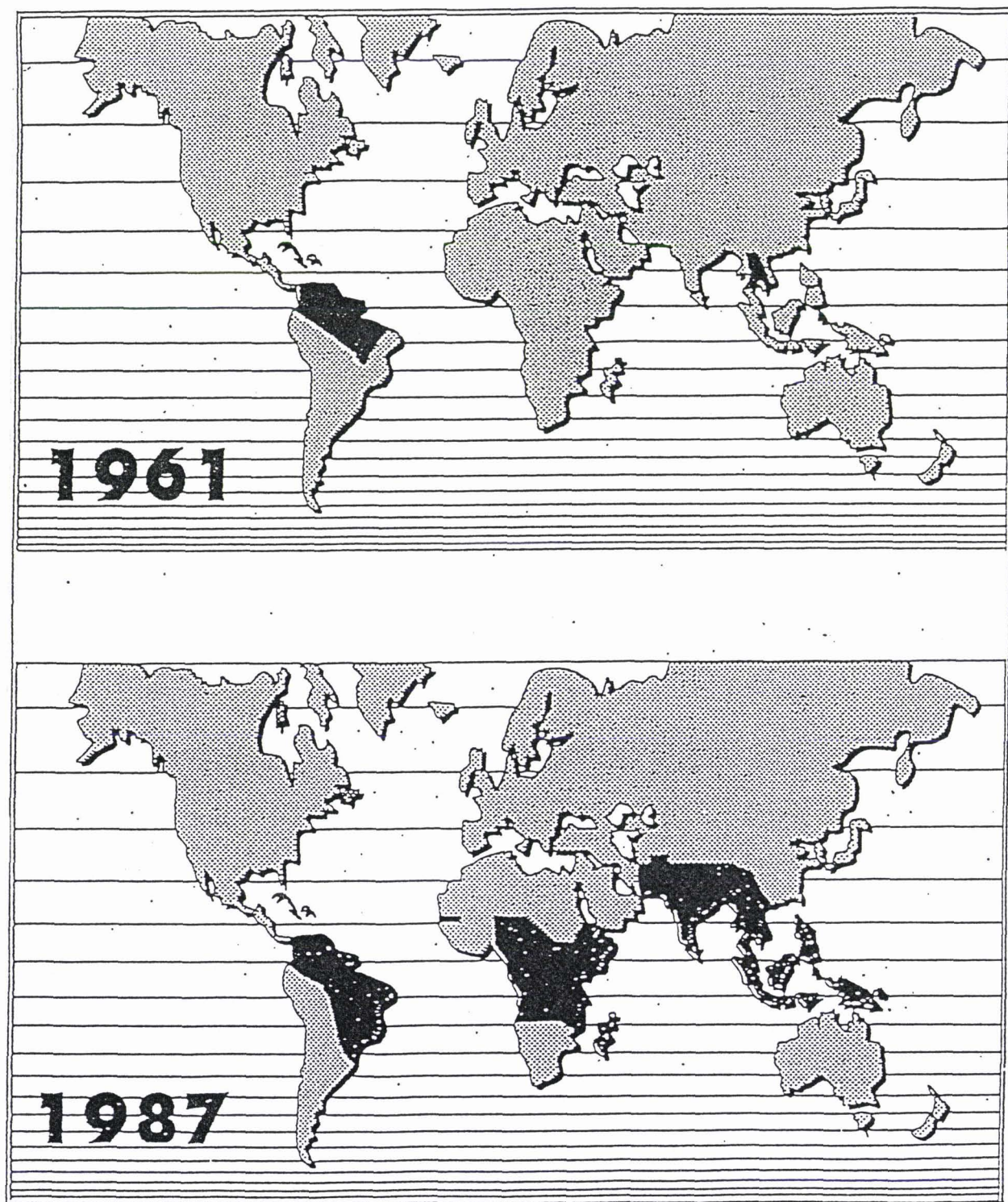
Schéma des processus d'endocytose chez Plasmodium chabaudi

On distingue :

Une micropinocytose sur toute la surface de contact hôte parasite ,y compris la vacuole nutritive(VN).

Un système cytotomal : à partir du cytotome (Cs) se forme une vacuole cytotostomale (VC) qui s'étend en un tube cytotomal (TC) à la périphérie du parasite. De l'extrémité distale de ce tube se détache des vacuoles.

Il est important de remarquer que la disparition de la membrane interne des vacuoles et vésicules précède le début de la dégradation de l'hémoglobine.



Extension des zones à Plasmodium falciparum chloroquino-résistant entre 1961 et 1987.

C)-CHIMIOTHERAPIE.

1)-Définition et historique.

La chimiothérapie du paludisme consiste en l'administration d'une substance médicamenteuse possédant une activité antiparasitaire.

L'homme a depuis longtemps cherché dans la nature un remède à ses maux. Si l'utilisation de l'écorce de quinquina par les indiens d'Amérique latine remonte à des temps immémoriaux, l'isolement et la caractérisation du principe actif de cette plante est récente. En effet, ce n'est qu'en 1820 que Pelletier et Caventou présentent leur mémoire sur l'isolement de la quinine à partir de l'écorce de quinquina.

L'extension des deux conflits mondiaux du XXIème siècle à des zones tropicales, intensifia la recherche militaire pour le développement de nouveaux antimalariques. La découverte des propriétés antimalariques des amino-4-quinoléines date de 1941.

La synthèse de nombreux antimalariques et la découverte du DDT insecticide rémanent dirigé contre l'anophèle, incitèrent les chercheurs à penser que le paludisme allait être éradiqué (67).

C'est alors que d'inquiétantes souches résistantes à la chloroquine firent leur apparition en Amérique latine et au Vietnam (68).

2)-Résistance aux antimalariques.

La résistance est définie par L'O. M. S. comme étant la possibilité pour une souche parasitaire 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 recommandées habituellement, sans toutefois dépasser les limites de tolérance du sujet.

La résistance revêt plusieurs stades allant d'une diminution de l'effet thérapeutique d'un médicament jusqu'à son inhibition totale.

Les figures de la page ci-contre montrent l'extension dramatique des souches de Plasmodium résistantes à la chloroquine.

3)-Les antimalariques.

Aujourd'hui l'homme dispose de plusieurs classes d'antimalariques. Ces classes sont définies arbitrairement selon la structure chimique, le niveau d'action sur le cycle parasitaire et enfin leur mode d'action .

On distingue:

- Les antimétabolites
- Les amino-8-quinoléines
- les schizonticides sanguins

a)-Les antimétabolites.

Le développement de la résistance aux amino-4-quinoléines a entraîné un regain d'activité dans la recherche d'antimétabolites ayant une action antipaludéenne.

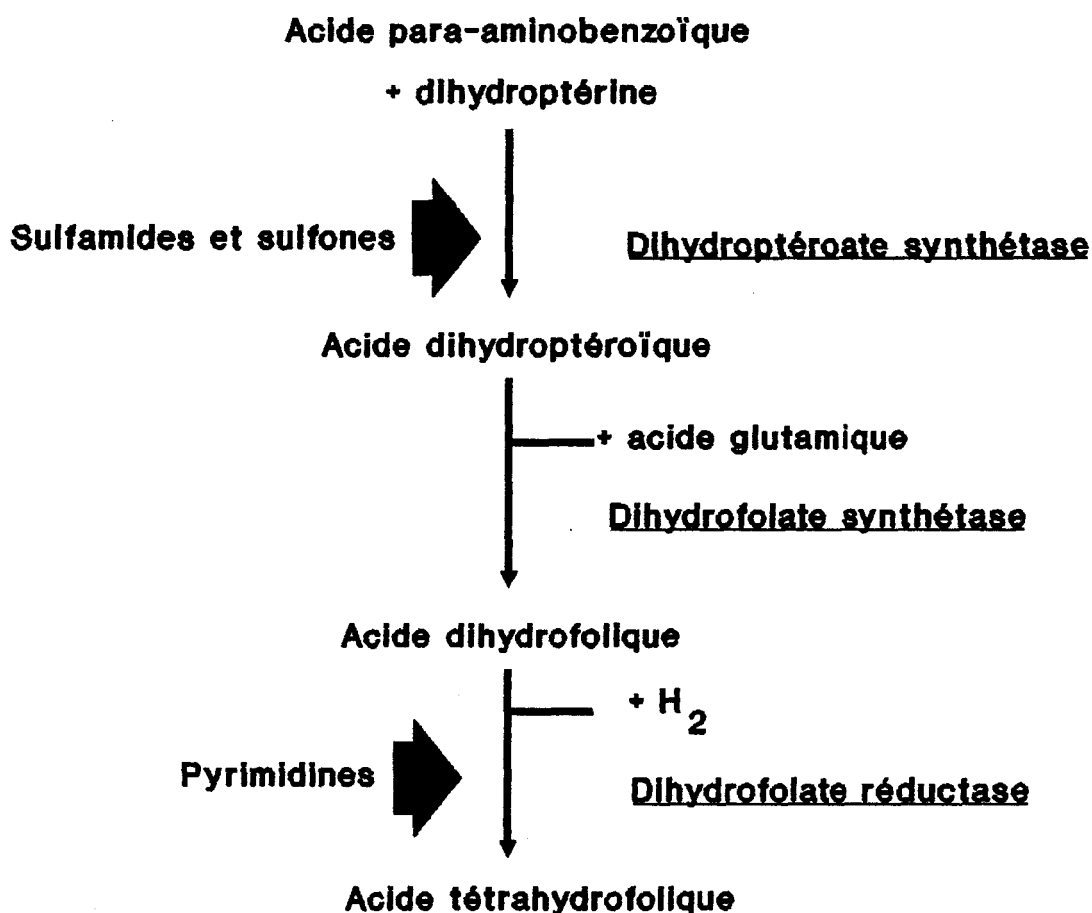
Ces antimétabolites se caractérisent par une action lente sur la presque totalité des stades parasitaires exceptés les gamétocytes. Nous relaterons ici à titre d'exemple le mécanisme d'action des plus utilisés : les antifolates.

Ces antifolates se classent en deux catégories:

-Les inhibiteurs de l'acide para-amino-benzoïque tels que les sulfamides et les sulfones.

-les inhibiteurs de la dihydrofolate réductase comme les pyrimidines.

Le schéma suivant illustre la biosynthèse de l'acide tétrahydrofolique ainsi que le niveau d'action des antifolates :



La pyriméthamine, inhibiteur de la dihydrofolate réductase, a été employée à grande échelle. Des souches de Plasmodium résistantes à cet antimétabolite sont rapidement apparues (69). Un des mécanisme de résistance à la pyriméthamine est la synthèse par les souches plasmodiales, d'une dihydrofolate réductase possédant une affinité réduite pour le dihydrofolate et la pyriméthamine.

b)-Les amino-8-quinoléines.

L'origine de cette série d'antimalariques est issue de l'observation de l'activité antiparasitaire du bleu de méthylène par Guttman et Erlich.

Les amino-8-quinoléines agissent sur tous les stades du développement du Plasmodium mais leur mode d'action exact est peu connu. Il est admis que ceux-ci sont de manière générale actifs par leurs métabolites.

En raison de leur toxicité pour l'homme, ils sont peu employés. Les thérapeutes les utilisent comme gamétocides et dans le traitement des formes hypnozoïtes de Plasmodium vivax et ovale.

c)-Les shizonticides sanguins.

Ils constituent la classe des antimalariques la plus utilisée actuellement tant en thérapie qu'en chimioprophylaxie. Ils agissent uniquement sur les stades intraérythrocytaires de façon très rapide.

L'objet de ce présent travail portant sur l'analyse du mécanisme de concentration préférentiel des amino-4-quinoléines chez le parasite, nous consacrerons le chapitre suivant à leur mode d'action.

Dans l'immédiat, nous nous contenterons de présenter les différentes classes de schizonticides.

-Les schizonticides possédant un noyau quinoléique.

Ils se classent généralement en deux groupes déterminés suivant des critères chimiques et biologiques que nous développerons plus tard.

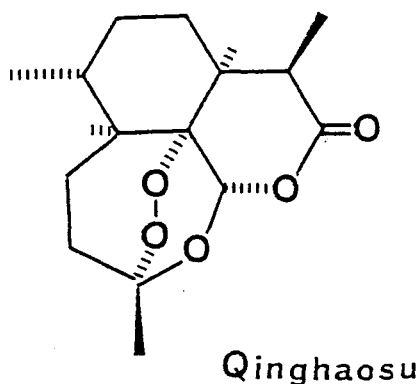
*Les molécules de type chloroquine

*les molécules de type quinine

-Artémisinine et ses dérivés

L'utilisation de ces shizonticides en thérapeutique moderne est très récente. Néanmoins, il faut noter que la pharmacopée chinoise relate depuis près de deux mille ans, l'activité antipyrétique et antipaludéenne des armoises. L'armoise et en particulier l'espèce *Artémisia annua* L est la plante dont est extraite l'artémisinine ou quinghaosu.

La structure chimique de l'artémisinine a été élucidée en 1973 par Jérémie et coll.



L'artémisinine étant peu soluble dans l'eau, il s'est avéré nécessaire de synthétiser des dérivés plus hydrosolubles tel que la dihydroartémisinine.

Ces composés sont de puissants schizonticides et sont efficaces sur les souches résistantes à la chloroquine. Son mode d'action est mal connu. Certaines hypothèses sont émises : inhibition de la synthèse des protéines, de l'ADN, ainsi que des changements de perméabilité membranaire.

En conclusion, l'artémisinine (le quinghaosu) est un médicament prometteur par sa rapidité d'action permettant son utilisation dans des cas graves de paludisme cérébral.

D)-SCHIZONTICIDES SANGUINS.

1)-Introduction.

La molécule la plus célèbre de cette classe de schizonticides est la chloroquine. Elle reste actuellement l'antimalarique le plus employé tant en chimioprophylaxie qu'en chimiothérapie. Son succès repose sur un bon index thérapeutique, une rapidité d'action et enfin son très faible prix de revient.

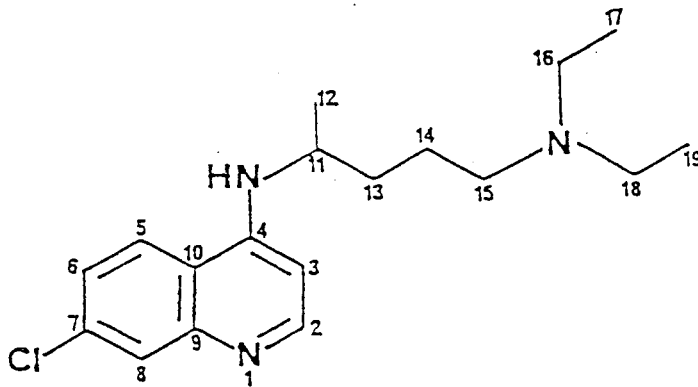
Dans ce chapitre nous nous proposons de présenter les caractéristiques de ces schizonticides en comparant les deux principaux groupes :

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

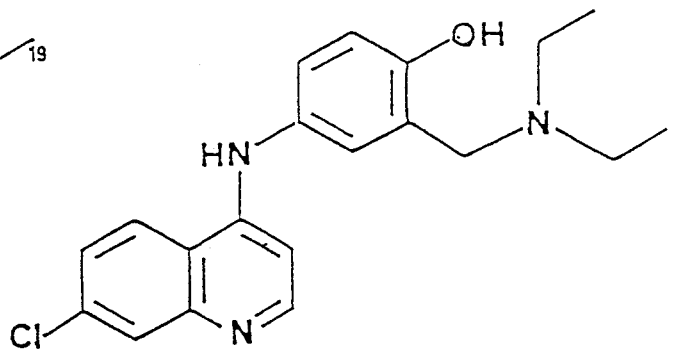
Pour cette comparaison, nous étudierons donc leur structure chimique, les relations structure-activité et enfin leurs propriétés biologiques.

2)-Structure chimique.

a)-Les molécules de type chloroquine.



CHLOROQUINE

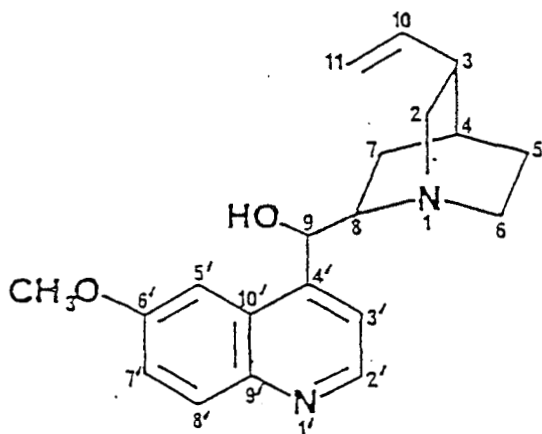


AMODIAQUINE

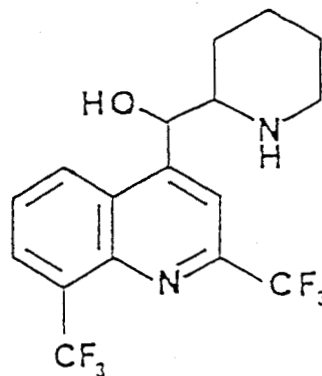
Les caractéristiques chimiques sont:

- un noyau quinoléique substitué en position 4 par un atome d'azote et en 7 par un atome de chlore
- une chaîne latérale en position 4 possédant un atome d'azote basique
- les propriétés de base faible de la chloroquine sont dues à la présence de 2 atomes d'azote basiques (l'atome d'azote en position 1 du noyau quinoléique de pka 8,06; l'atome du groupement diéthylamine de pka 10,16).

b)- Les molécules de type quinine.



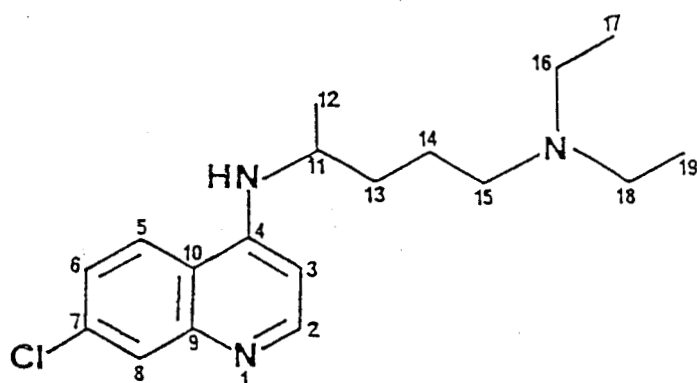
QUININE



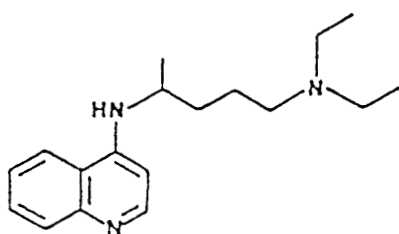
MEFLOQUINE

Les caractéristiques de la quinine sont :

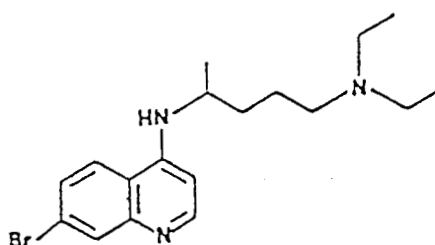
- toujours la présence d'un noyau quinoléique
- une fonction alcool
- un atome d'azote basique en position 1 de pka 8,4; celui de l'azote du noyau aromatique étant de 4,3.



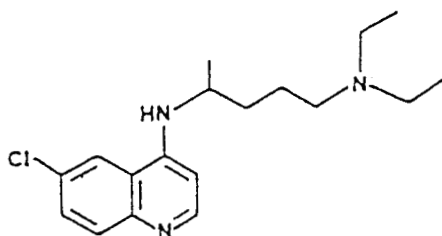
CHLOROQUINE



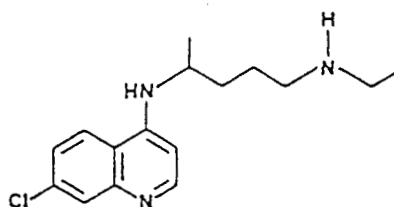
SN 6732



SN 7373



WR 8671



WR 29623

3)-Relations structure-activité.

Les chercheurs ont synthétisé de nombreuses molécules en ayant comme point de départ la chloroquine et la quinine dans l'espoir d'améliorer les propriétés antiplasmodiales. Les relations structure-activité sont issues de la comparaison entre la structure chimique et l'activité antimalarique de ces molécules.

a)-La chloroquine.

*)-Modification du noyau quinoléique.

Le simple remplacement de l'atome de chlore en position 7 par un atome d'hydrogène conduit à une molécule (SN6732) dont l'activité antimalarique est réduite à 7% (2).

Le déplacement de cet atome de chlore (position 7) en position 6 (WR 8671) n'altère pas son activité. Celle-ci diminue de 97% lorsqu'on déplace le chlore en position 5 ou 8 (2).

L'activité *in vitro* est diminuée en moyenne de 50% si l'on remplace le chlore par un brome (SN 7373) (halogène plus volumineux) ou par un atome de fluor (atome moins lipophile) ou un groupement trifluorométhyle (2).

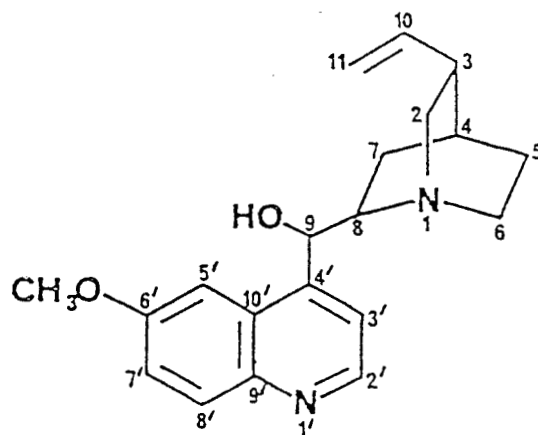
Autre modification remarquable, l'action de la chloroquine est diminuée de 90% lorsque l'hydrogène en position 2 est substitué par un groupement méthyle (CH_3).

*)-Modification de la chaîne latérale.

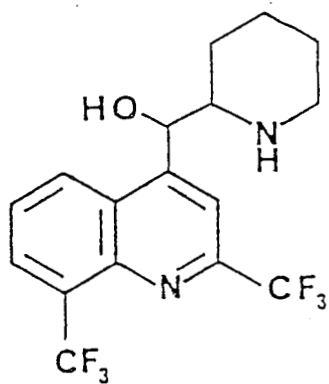
Le remplacement de l'atome d'azote terminal par un atome de carbone entraîne une chute de l'activité antiplasmodiale de la chloroquine, aussi bien *in vitro* qu' *in vivo*.

La perte d'un groupement éthyle de l'azote terminal et son remplacement par un atome d'hydrogène donne la chloroquine monoéthylée. Cette dernière possède une activité diminuée de 50% par rapport à la chloroquine.

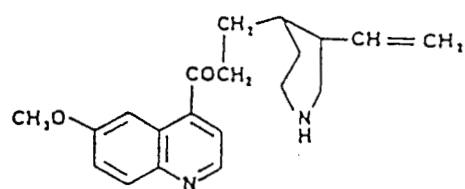
L'introduction de la structure dialkylamino-O-crésol sur la chaîne latérale conduit à des molécules plus actives que la chloroquine. Citons pour exemple l'amodiaquine.



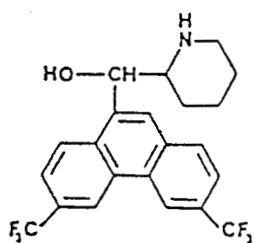
QUININE



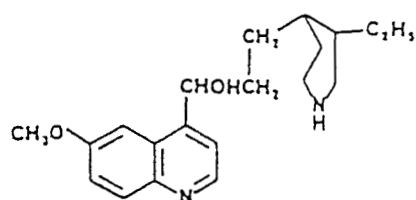
MEFLOQUINE



QUINIDINE



WR 122455



DIHYDROQUININOLINOL

En conclusion de ces expériences, nous retiendrons plusieurs faits quant à l'activité antiplasmodiale :

- la présence de l'atome de chlore en position 6 ou 7 est indispensable à l'activité antiplasmodiale
- l'environnement de l'azote aromatique (position 1) joue un rôle important
- l'atome d'azote terminal de la chaîne latérale est nécessaire à l'action antimalarique de la chloroquine.

b)-La quinine.

***)-Noyau quinoléique.**

Contrairement à la chloroquine, l'environnement de l'atome d'azote quinoléique n'influence pas son activité, citons pour exemple la méfloquine. La suppression de cet atome conduit à une molécule WR122455 qui est un excellent antimalarique (3) .

***)-Modification de la chaîne latérale.**

L'élément important à signaler est que l'activité antimalarique est liée à la stéréochimie de l'atome de carbone en position 9, dont la configuration doit être R. L'épimère en 9 (épiquinine) (configuration S) est inactif.

La fonction hydroxyle du carbone 9 joue un rôle indéniable dans l'activité, la substitution par un halogène, une cétone ou bien son remplacement diminue fortement l'effet antimalarique.

Pour terminer, les quinicines et les dihydroquinicinols issues de la rupture de la liaison entre le carbone 8 et l'azote 1 sont des substances inactives (4) .

4)-Les propriétés biologiques.

L'action de la chloroquine sur le Plasmodium se caractérise par:

- une accumulation rapide de celle-ci dans le parasite
- une coalescence du pigment malarique.

a)-concentration intraparasitaire de la chloroquine.

Très rapidement, il fut démontré que la chloroquine se concentre dans les hématies parasitées par Plasmodium berghei (Plasmodium murin) (5). Les rapports entre la concentration de chloroquine intracellulaire sur l'extracellulaire sont les suivants :

- 600/1 hématies parasitées par une souche sensible
- 100/1 hématies parasitées par une souche résistante
- 14/1 érythrocytes non parasités.

Ces expériences sont réalisées *in vitro* pour une concentration extracellulaire de 10^{-8} M en chloroquine (6). Cette concentration intraparasitaire de la chloroquine est saturable et dépend à la fois des fonctions énergétiques de la cellule et du pH extracellulaire.

En effet, on constate expérimentalement que cette concentration est stimulée en présence de pyruvate, lactate, glucose ou glycérol (7).

Une augmentation du pH extracellulaire entraîne une élévation de la quantité de chloroquine accumulée.

Enfin signalons l'existence d'inhibiteurs compétitifs pour cette accumulation tels que l'amodiaquine, la quinine (8).

b)-Coalescence du pigment malarique.

En microscopie électronique, le résidu de la dégradation de l'hémoglobine, c'est à dire le pigment malarique, est visualisé sous forme de cristaux contenus dans les vésicules pigmentaires. A l'heure actuelle, la structure du pigment n'est pas déterminée. Il serait formé d'une association de protéine et de porphyrine.

La coalescence du pigment malarique ou "pigment clumping" est le premier effet visible de la chloroquine. Chez des souris infestées par Plasmodium

berghei, on observe 30 à 35 minutes après l'injection de chloroquine, une fusion des vésicules pigmentaires pour arriver au bout de 80 minutes à une ou deux grosses vacuoles résiduelles (9). La dose de chloroquine donnant une coalescence de 50 % du pigment parasitaire est de $2 \cdot 10^{-8}$ M (10). Cette valeur est très voisine de la constante de dissociation du complexe chloroquine parasite ($K_d = 10^{-8}$ M) déterminé par Fitch (11)

Cette coalescence provoquée par la chloroquine est inhibée de façon compétitive par des drogues de type chloroquine ou de type quinine. Ces dernières ne provoquent pas la coalescence du pigment mais plutôt sa dispersion.

Des études sur les relations structure activité on peut retenir :

Tout comme pour l'activité antimalarique, l'atome de chlore en position 7 est indispensable pour la coalescence de même que l'azote N Terminal de la chaîne latérale.

c)-Conclusion.

Partant de ces deux propriétés biologiques particulières, des hypothèses ont été émises pour rendre compte de ces effets biologiques. Les chercheurs ont suggéré l'intervention de récepteurs biologiques pour les schizonticides sanguins.

Trois hypothèses majeures se sont dégagées des travaux concernant la recherche du ou des récepteurs aux schizonticides chez le parasite .

1ère hypothèse : Interaction avec ADN parasitaire

2ème hypothèse : Concentration dans les lysosomes

3ème hypothèse : Interaction avec la ferriprotoporphyrine IX

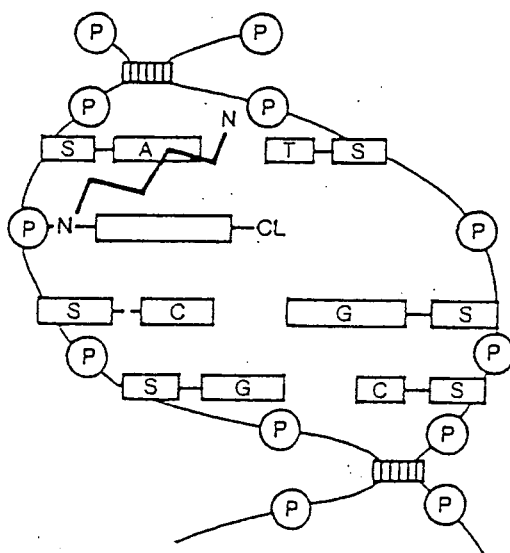
Nous nous proposons maintenant d'examiner ces différentes approches.

5)-Mode d'action des schizonticides sanguins.

a)-Interaction avec ADN parasite.

Partant de la découverte des propriétés intercalantes de la chloroquine (12) pour la double hélice ADN, Hahn et O'Brien (13) proposent que l'activité antimalarique de la chloroquine soit reliée à ses facultés de s'intercaler dans le DNA parasite.

Le schéma suivant représente l'intercalation de la chloroquine-DNA selon O'Brien et Hahn.



Cette hypothèse présente de nombreux d'écueils : la constante d'affinité mesurée dans des conditions physiologiques, pour l'interaction CLQ-DNA est de l'ordre de 10^4 M^{-1} , celle-ci est trop faible pour expliquer la concentration intraparasitaire du médicament. De plus la coalescence du pigment malarique sous l'effet de la chloroquine intervient une heure après l'injection, à ce stade la biosynthèse des macromolécules n'est pas encore affectée. Enfin, la méfloquine ne s'intercale pas dans le DNA, alors qu'elle est un excellent antimalarique.

Pour toutes ces raisons précédemment invoquées, il est peu probable que l'ADN constitue le récepteur de la chloroquine.

b)-Interaction chloroquine ferriprotoporphyrine IX.

La rapidité du phénomène de coalescence du pigment malarique induit par la chloroquine et sa possibilité d'inhibition par des molécules de type quinine ont fait suggérer à certains auteurs que le récepteur de la chloroquine était le pigment malarique ou l'un de ses constituants.

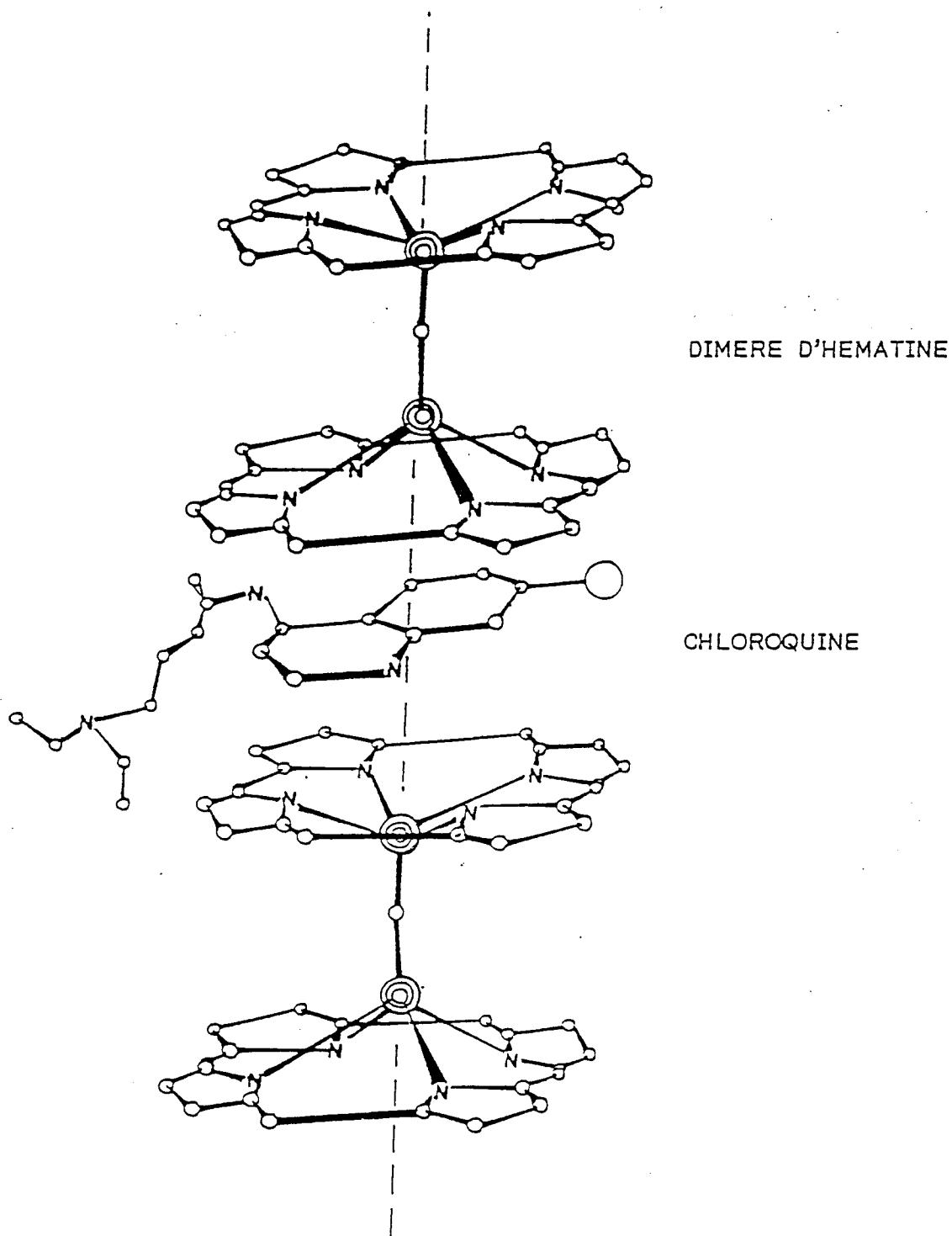
L'observation d'une interaction entre la chloroquine et l'hématine libérée par action protéolytique, datant de 1964, (14) a été reprise et étudiée en 1980 par Chou et coll (15). Ces derniers ont mis en évidence une forte affinité de la protoporphyrine IX ou hématine envers la chloroquine. La mesure de la constante d'affinité mesurée par dialyse à l'équilibre aboutit à une valeur de $2,8 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ très similaire à la constante d'affinité entre le parasite et la chloroquine. Cette affinité étant également inhibée par des molécules telles que la quinine ou la méfloquine.

L'hypothèse émise par Chou et Fitch (15) décrit que la concentration intraparasitaire de la chloroquine est due à l'interaction chloroquine-hématine, l'hématine provenant de la dégradation de l'hémoglobine par le parasite. L'activité antimalarique étant associée au complexe chloroquine-hématine. Ce dernier aurait une action lytique sur les membranes parasitaires. La chloroquine agirait donc en inhibant la formation du pigment malarique, celui-ci étant considéré comme la forme de détoxification de l'hématine par le parasite.

Diverses observations et faits expérimentaux ne confirment pas complètement cette hypothèse. Dans un premier temps, l'étude de l'action de la chloroquine en microscopie électronique n'a jamais permis d'observer une lyse des membranes parasitaires même celles des vacuoles pigmentaires.

D'autre part, des études de R. M. N. (16) démontrent que les interactions entre l'hématine et la chloroquine sont essentiellement de type hydrophobe et donc ne rendant pas compte des relations structures-activités.

D'après le schéma suivant (16), on constate que l'atome de chlore et l'azote de la chaîne latérale ne participent pas au complexe, pourtant ils sont indispensables à l'activité antimalarique.

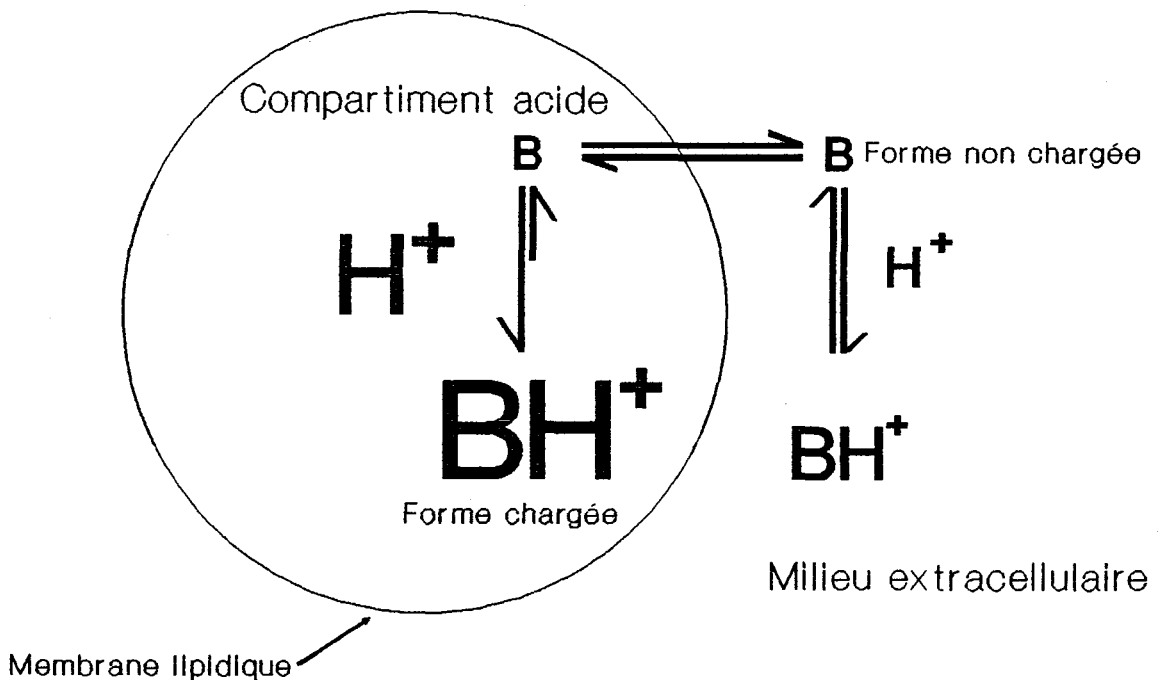


Si l'observation à l'origine de cette hypothèse était séduisante, elle n'est pas satisfaisante pour expliquer le mécanisme d'action de la chloroquine.

c)-Concentration intralysosomiale.

La chloroquine se concentre dans les lysosomes (17). Les lysosomes sont des compartiments cellulaires acides contenant un large panel d'hydrolases acides. Cette propriété lysosomotrope est probablement à l'origine de son utilisation dans le traitement de l'arthrite rhumatoïde (18). Cette maladie caractérisée par une réaction inflammatoire localisée au niveau des articulations. Au cours de cette affection, il y a rupture des membranes lysosomiales. Les enzymes ainsi libérés dans les cellules puis le tissu conjonctif sous-jacent provoquent la détérioration des articulations. La chloroquine agirait en stabilisant les membranes des lysosomes et en inhibant certaines des hydrolases (19).

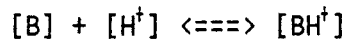
Le mécanisme de concentration intralysosomiale requiert les propriétés de base faible de la chloroquine. Le schéma suivant illustre le mécanisme proposé pour la concentration des bases faibles dans un compartiment acide isolé du milieu externe par une membrane lipidique:



La concentration des formes non chargées est identique à chaque instant dans les deux compartiments extracellulaire et intracellulaire. Autrement dit, seules les formes non chargées franchissent librement la barrière hydrophobe

formée par la membrane plasmique. Cette dernière étant imperméable aux formes chargées.

Il est possible de calculer la concentration de la base dans chaque compartiment. Prenons l'exemple d'une monobase. La réaction chimique de protonation de cette base peut s'écrire :



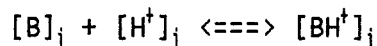
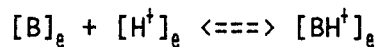
-Soit : $[B]_e$ la concentration de la forme non chargée de la base dans le milieu extracellulaire.

$[B]_i$ la concentration de la forme non chargée de la base dans le milieu intracellulaire.

$[H^+]_e$ la concentration en protons dans le milieu extracellulaire.

$[H^+]_i$ la concentration en protons dans le milieu intracellulaire.

On peut donc écrire:



Les bases neutres étant en équilibre de part et d'autre de la membrane, on en déduit :

$$[B]_e = [B]_i$$

K_{Ae} et K_{Ai} , les constantes d'équilibre de dissociation des bases respectivement dans le milieu extracellulaire et intracellulaire.

$$K_{Ae} = \frac{[B]_e [H^+]_e}{[BH^+]_e} \quad K_{Ai} = \frac{[B]_i [H^+]_i}{[BH^+]_i}$$

Or $K_{Ae} = K_{Ai}$ (car la constante de dissociation est une propriété intrinsèque de la molécule)

$$\frac{[B]_e [H^+]_e}{[BH^+]_e} = \frac{[B]_i [H^+]_i}{[BH^+]_i}$$

comme $[B]_e = [B]_i$

on obtient :

$$\frac{[H^+]_e}{[BH^+]_e} = \frac{[H^+]_i}{[BH^+]_i}$$

d'où
$$\frac{[BH^+]_i}{[BH^+]_e} = \frac{[H^+]_i}{[H^+]_e}$$

Soit $[B_T]_i$ et $[B_T]_e$ la concentration totale des formes basiques respectivement intracellulaire et extracellulaire, on peut écrire:

$$[B_T]_i = [B]_i + [BH^+]_i \text{ et } [B_T]_e = [B]_e + [BH^+]_e$$

Pour le cas d'une base forte, pK_a ($= -\log K_a$) est supérieur au pH physiologique des deux compartiments. La forme neutre devient négligeable :

$$[B_T]_i = [BH^+]_i \text{ et } [B_T]_e = [BH^+]_e$$

On en déduit:
$$\frac{[B_T]_i}{[B_T]_e} = \frac{[H^+]_i}{[H^+]_e}$$

On montre que dans un mécanisme de concentration lysosomotrope, le rapport des concentrations en base totale est égal au rapport des concentrations en protons. Pour une dibase, en suivant un raisonnement analogue, on démontre que le rapport de la concentration des bases est égal au carré du rapport des concentrations en protons.

D'après ces équations, pour avoir accumulation d'une base faible par un mécanisme lysosomotrope, il faut nécessairement un compartiment cellulaire de pH plus faible que le milieu extracellulaire.

$$\frac{[B_T]_i}{[B_T]_e} > 1 \Leftrightarrow [H^+]_i > [H^+]_e$$

En 1972, Homewood et coll. (20) proposent l'intervention d'un mécanisme lysosomotrope pour rendre compte des propriétés antimalariques de la chloroquine comme étant responsable de l'activité antimalarique. De nombreux travaux ont été consacrés à l'analyse de cette hypothèse. L'analyse détaillée de ces diverses données expérimentales est à la base de l'approche choisie par le laboratoire pour l'étude du mode d'action antimalarique des amino-4-quinoléines. Nous nous proposons de consacrer un chapitre à leur étude.

E)-CONCENTRATION INTRALYSOSOMIALE DE LA CHLOROQUINE.

Dans l'hypothèse émise par Homewood et al., la chloroquine se concentre par un mécanisme lysosomotrope, dans les vacuoles digestives supposées acides et inhibe la digestion enzymatique de l'hémoglobine par le parasite. L'inhibition des enzymes est imputée à la remontée du pH dans les vacuoles, celle-ci étant induite par l'effet base faible de la chloroquine.

Cette hypothèse se décompose en trois idées

- L'existence d'un compartiment acide de type lysosome chez Plasmodium.

- Ce compartiment est formé par les vacuoles digestives du parasite, lieu de dégradation de l'hémoglobine.

- La chloroquine se concentre dans ces vacuoles digestives selon un mécanisme lysosomotrope, entraînant du fait de son caractère basique une remontée du pH. Celle-ci ayant pour conséquence une inhibition de la dégradation de l'hémoglobine.

Néanmoins, cette hypothèse ne rend pas compte de la différence existant entre l'action des amino-4-quinoléines sur le parasite et celle observée chez les cellules de mammifères. En effet, l'action antiparasitaire de ces drogues est effective à des concentrations de 100 à 1000 fois plus faibles que celles nécessaires à leurs concentrations lysosomotropes chez les cellules de mammifères (21).

1)-Existence d'un compartiment acide.

La preuve de l'existence d'un compartiment acide repose sur des techniques de mesure de pH intracellulaire. Bien que les techniques de mesure de pH intracellulaire soient assez nombreuses (22), peu sont applicables au Plasmodium en raison de sa complexité.

Des mesures reposant sur la distribution des bases faibles radiomarquées ont été réalisées (23). Cette technique est bien adaptée pour un système se composant uniquement de deux compartiments (milieu extracellulaire et intracellulaire). Le modèle Plasmodium possède quatre compartiments (milieu extracellulaire, cytoplasmes érythrocytaire et parasitaire et des vacuoles digestives). De plus, le calcul du pH à partir de la distribution des bases faibles, suppose connu le volume des compartiments impliqués. Or, pour le parasite on a recours à des estimations plus ou moins précises du volume de ces différents compartiments.

L'autre technique employée utilise la propriété de certains marqueurs de fluorescence (ex : Fluorescéine dextran) (23, 24). Le rapport de l'intensité de fluorescence déterminée à deux longueurs d'onde d'émission bien précises est fonction du pH du milieu où se trouve le marqueur (25). Le principe de cette manipulation se décompose en trois étapes.

- Incorporation de fluorescéine-dextran dans des hématies saines
- Infestation de ces hématies par le Plasmodium, celui-ci en se développant, endocyte l'hémoglobine ainsi que le marqueur fluorescent.
- Avant d'effectuer la mesure, le marqueur fluorescent contenu dans le cytoplasme érythrocytaire non digéré est éliminé soit par chocs osmotiques soit en utilisant un détergent tel que la saponine.

Par cette méthode, la quasi totalité du marqueur se trouve dans des zones délimitées du parasite supposées être des vacuoles digestives. On peut émettre comme critique que la mesure de pH s'effectue sur un parasite libre et non pas intègre, c'est à dire dans l'hématie parasitée.

Malgré l'imprécision relative des mesures effectuées, compte tenu des difficultés expérimentales, l'existence d'un compartiment acide chez Plasmodium ne soulève plus aucun doute. Le pH estimé étant voisin de cinq.

2)-La vacuole digestive.

De nombreuses études ultrastructurales et biochimiques ont caractérisé la vacuole digestive comme étant le lieu de dégradation de l'hémoglobine. Par exemple, la phosphatase acide, enzyme marqueur des lysosomes, a été mise en évidence dans les vacuoles chez Plasmodium berghei (26, 27). Une endoprotéase capable de dégrader l'hémoglobine a été localisée dans le parasite (28, 29).

3)-Mécanisme lysosomotrope.

D'autres expériences viennent confirmer l'hypothèse de concentration lysosomotrope de la chloroquine émise par Homewood et coll. . D'une part, des bases faibles, comme le chlorure d'ammonium, entrent en compétition avec la chloroquine, c'est à dire qu'elles sont capables de provoquer la libération d'une partie du médicament accumulé préalablement dans le parasite (23). D'autre part, l'accumulation de la chloroquine est dépendante du pH extracellulaire (25).

Une étude réalisée par Aikawa (31) consistant en une localisation ultrastructurale par autoradiographie de chloroquine tritiée suggère que la vacuole digestive est bien le site de concentration de la chloroquine. Cette démonstration, non plus, n'est pas très rigoureuse et est sujette à certaines critiques. La faiblesse du marquage obtenu est certainement imputable à la perte d'une partie de la sonde radioactive lors des lavages successifs nécessaires à la préparation de l'échantillon. Les grains d'argent irradiés ciblant la vacuole digestive ont pu être impressionnés par une émission de radioactivité provenant d'un plan de coupe sous-jacent à la vacuole digestive (c'est à dire en dehors de la vacuole). Pour l'instant, l'ensemble des expériences précédentes démontre l'existence d'un compartiment acide où

l'hémoglobine est dégradée. Il n'est pas démontré que celui-ci soit le site de concentration des amino-4-quinoléines.

Quant à une éventuelle remontée du pH de la vacuole digestive induite par la chloroquine, là aussi on trouve dans la littérature des résultats contradictoires (32, 33, 30).

4)-Synthèse.

L'analyse de ces résultats a conduit le laboratoire vers une nouvelle méthode expérimentale reposant sur une visualisation directe des compartiments acides cellulaires et des sites d'accumulation de la chloroquine. Il s'agit de l'immunodétection, sur coupes ultrafines à congélation, de deux sondes :

La sonde CQA, un analogue de la chloroquine, mise au point pour permettre la localisation des sites d'accumulation de la chloroquine.

Le DAMP [(N-dinitroanilo-2,4)-3 amino 3'methyldipropylamine] développé par Anderson et coll. (35) rend possible la détermination des compartiments acides cellulaires.

Les travaux effectués sur deux souches de Plasmodium murins. Une souche P.berghei N sensible à la chloroquine et une souche P.berghei RC (résistante) ont aboutit aux conclusions suivantes (34, 37) :

Le site d'accumulation du médicament chez la souche sensible est bien constitué par la vacuole digestive. La co-localisation du DAMP a permis de confirmer le caractère acide des vacuoles digestives de Plasmodium.

Par contre, la souche résistante accumule encore la chloroquine mais la rétention de la drogue a lieu dans l'ensemble du cytoplasme parasitaire. Ce cytoplasme présente par ailleurs un caractère acide d'après les indications de la sonde DAMP.

Nous avons voulu compléter ce travail en abordant les trois aspects suivant qui font l'objet de cette thèse :

- Préciser le parallélisme apparent entre le site de concentration des amino-4-quinoléines et les compartiments acides.

- Dissocier les effets de la chloroquine dus aux propriétés antimalariques d'une part et aux propriétés basiques d'autre part. Ceci afin d'éclaircir les rôles respectifs de ces propriétés dans le phénomène de concentration intraparasitaire de la chloroquine. Nous avons donc étudié selon différents paramètres le comportement d'une sonde amino-4-quinoléine : la chloroquine sans chlore, qui a été conçue dans le but de conserver les propriétés basiques sans être antimalarique.

- Une analyse cinétique d'incorporation des bases faibles antimalariques et non antimalariques chez l'hématie parasitée et saine.

Le présent travail a fait l'objet des publications suivantes :

Mahmalgi J., Veignie E., Prensier G., Moreau S. Relation between resistance to chloroquine and acidification of endocytic vesicle of Plasmodium berghei. Parasitology 1989 ; 98 : 1-6.

Moreau S., Veignie E., Use of long range ^1H ^{13}C correlation experiments (COLOC) for the assignment of the ^{13}C NMR spectrum of chloroquine and 4-aminoquinoline compounds. Magn. Res. Chem. 28 (4) : 377-379, 1990.

Veignie E., Moreau S., Mode of action of chloroquine : Non weak base properties of 4-aminoquinolines and antimalarial effects on P.berghei strains. Annals of Tropical Medecine and Parasitology (à paraitre decembre 1990).

Résultats

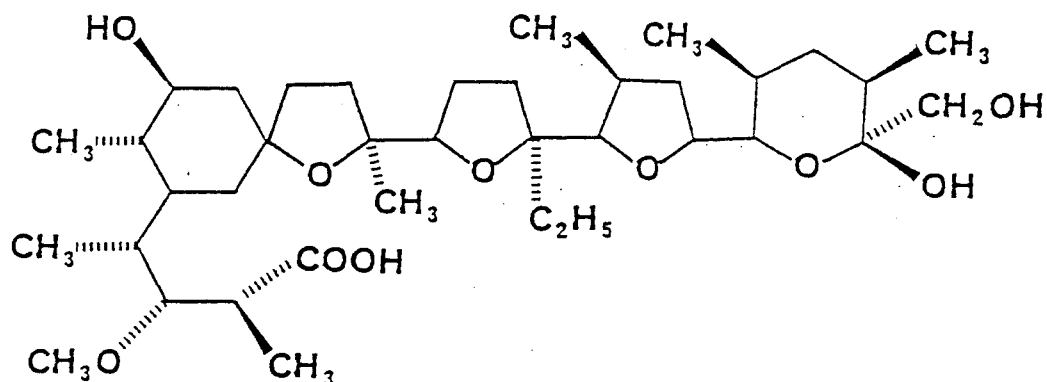
A)-DETERMINATION DES COMPARTIMENTS ACIDES CHEZ P.berghei.

La localisation de la sonde DAMP obtenue chez la souche berghei RC (résistant à la chloroquine) semble indiquer un caractère acide pour le cytoplasme du parasite (37). Il est apparu nécessaire de contrôler l'origine de la dispersion du DAMP. La densité du marquage reflète-t-elle véritablement le caractère acide du cytoplasme parasitaire ou alors est-elle de nature artéfactuelle ? En effet, pour cibler les compartiments acides, une base faible a été utilisée ($pK_a=10,2$ pour le DAMP). La concentration de la base faible dans les vacuoles digestives pouvant entraîner une remontée du pH, il pourrait s'en suivre une diffusion du marqueur (préalablement accumulé) à l'extérieur du compartiment acide.

Pour résoudre cette ambiguïté, nous avons décidé de localiser les compartiments acides par une méthode ne faisant pas appel à une base faible.

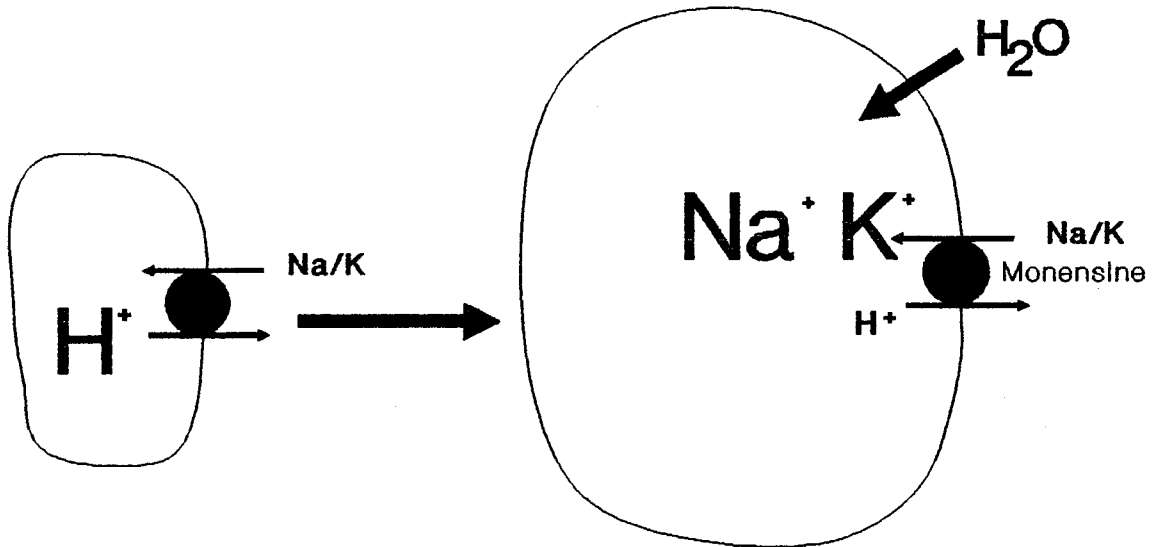
1)-Structure et intérêt de la monensine.

La monensine est un antibiotique ionophore.



Elle permet en se fixant dans les membranes biologiques d'échanger des protons contre des ions sodium et/ou potassium. Elle possède la propriété d'induire le gonflement par chocs osmotiques des citernes acides de l'appareil de Golgi (36).

Le schéma suivant illustre le gonflement de compartiment acide par la monensine.



Les ions sodium et potassium en se concentrant augmenteraient considérablement l'osmolarité à l'intérieur du compartiment. La différence d'osmolarité entraînerait un afflux d'eau à l'intérieur. La conséquence de ce phénomène, observable en microscopie, étant un gonflement des structures riches en protons. Il s'agit donc d'un moyen de détecter les compartiments acides sans l'addition d'une base faible susceptible de les neutraliser.

2)-localisation des compartiments acides chez P.berghei.

En utilisant cette propriété de la monensine, nous avons localisé les structures acides chez deux souches de plasmodium murin :

-P.berghei N (sensible à la chloroquine)

-P.berghei RC (résistant à la chloroquine)

Des souris parasitées par P.berghei N ou RC (parasitémie de 40 %) reçoivent par voie intrapéritonéale une injection unique de monensine dosée à 10 mg/kg. Quarante minutes plus tard, le sang est prélevé par saignée rétro-orbitale et fixé dans un mélange de glutaraldéhyde et de cacodylate.

Après inclusion dans une résine d'épon ,des coupes ultrafines sont réalisées en vue de leur observation au microscope électronique.

a)-Résultats.

Le gonflement des vacuoles digestives, obtenu chez la souche de Plasmodium sensible à la chloroquine, est en accord avec les résultats de la sonde DAMP et donc confirme leur caractère acide (planche I).

A l'inverse, on observe chez la souche P.berghei RC, une discordance entre les résultats obtenus avec le DAMP et ceux de la monensine. En effet, on constate un gonflement des vacuoles digestives de la souche résistante sous l'action de la monensine. Ce résultat indique le caractère acide de ces vacuoles et il est donc opposé au résultat obtenu avec la sonde DAMP. Celle-ci marque l'ensemble du cytoplasme parasite chez P.berghei RC et n'est pas particulièrement concentrée dans les vacuoles digestives (planche I).

3)-Discussion.

Le but de l'utilisation de la monensine était de déterminer si l'origine de la dispersion du DAMP dans l'ensemble du cytoplasme parasite chez la souche P.berghei RC correspondait à un phénomène d'acidification de celui-ci. Le gonflement des vésicules digestives de cette souche induit par la monensine indique pour ces dernières un pH acide.

Il serait donc raisonnable de penser que la dispersion du DAMP et des amino-4-quinoléines dans le cytoplasme de P.berghei RC a pour origine une diffusion de la sonde de la vacuole digestive vers le cytoplasme. La remontée de pH dans les vacuoles de la souche résistante serait induite par la concentration des bases faibles (sondes).

Ce résultat intéressant nous a permis d'élaborer une hypothèse concernant la résistance des souches de plasmodium à la chloroquine. En effet, Moreau et coll (34) ont clairement montré que le site d'action des amino-4-quinoléines est la vacuole digestive du Plasmodium. La monensine prouve

l'existence de compartiments acides cellulaires composés des vacuoles parasitaires chez les souches sensible et résistante à la chloroquine. La souche sensible serait capable de maintenir le bas pH de ces vacuoles même sous l'effet des bases faibles et donc de garder la chloroquine au contact de son (ou ses) site d'action. A l'inverse, les vacuoles digestives de la souche RC, seraient incapables de compenser la remontée de pH induite par les bases faibles entraînant la diffusion du médicament hors de son site d'action.

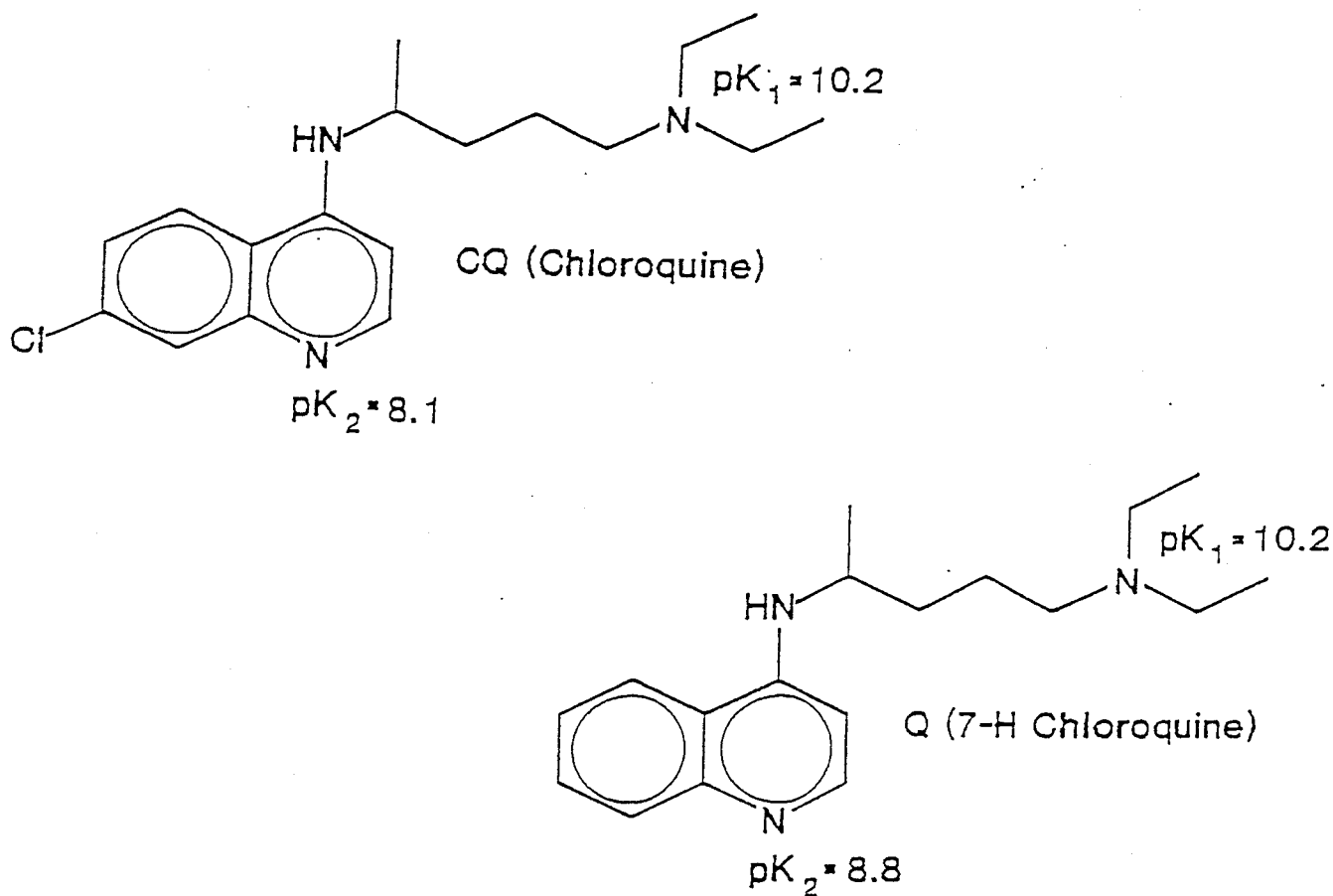
Des pompes à protons ont été mises en évidence par Mikkelsen et coll (66) dans le système vésiculaire de Plasmodium. Une déficience de celles-ci chez la souche P.berghei RC pourrait expliquer l'incapacité à maintenir le pH acide sous l'effet des bases faibles et en particulier de la chloroquine. Une autre explication possible est une inhibition de ces pompes par la chloroquine.

La localisation des amino-4-quinoléines et la détermination des compartiments acides par le DAMP et la monensine confirment l'intervention d'un gradient de protons dans le mécanisme de concentration de la chloroquine comme suggéré dans l'hypothèse émise par Homewood (20). Néanmoins, ces résultats n'expliquent pas la sélectivité particulière des schizonticides sanguins pour le parasite intraérythrocytaire.

Afin de déterminer le rôle réellement joué par les propriétés de base faible dans la concentration intraparasitaire de la chloroquine, nous avons envisagé une nouvelle approche consistant à séparer les propriétés de base faible de la chloroquine de ses propriétés antimalariques.

B)-ROLE DES PROPRIETES DE BASE FAIBLE DE LA CHLOROQUINE DANS SON MECANISME D'ACCUMULATION INTRAPARASITAIRE.

Le but de cette nouvelle approche est de dissocier les effets antimalariques de la chloroquine de ses propriétés de bases faibles. Nous avons donc choisi comme modèle, une molécule dont la différence avec la chloroquine (CLQ) réside en la disparition de l'atome de chlore en position 7 du noyau quinoléine. Cette 7-H chloroquine ou chloroquine sans chlore perd 93 % de l'activité antimalarique de la chloroquine (38) tout en gardant intactes les propriétés de base faible. Les pKa (39) respectifs de ces deux molécules indiqués dans la figure suivante sont en effet très proches.



L'étude entreprise consiste en une comparaison de ces deux molécules (Q et CLQ) essentiellement au niveau de deux paramètres :

- le site de concentration de ces molécules chez le Plasmodium.
- les quantités accumulées par le parasite.

1)-Détermination du site de rétention de la 7-H chloroquine.

La localisation dans les structures parasitaires d'une molécule nécessite:

- La possibilité d'obtention d'anticorps spécifiques dirigés contre cette molécule.
- La rétention de la molécule dans les structures parasitaires et son accessibilité pour la reconnaissance par l'anticorps.

Forts de l'expérience acquise par le laboratoire dans cette technique (40), nous avons entrepris la synthèse d'une sonde dont la structure doit répondre aux exigences préalablement définies.

a)-Synthèse de la sonde QA

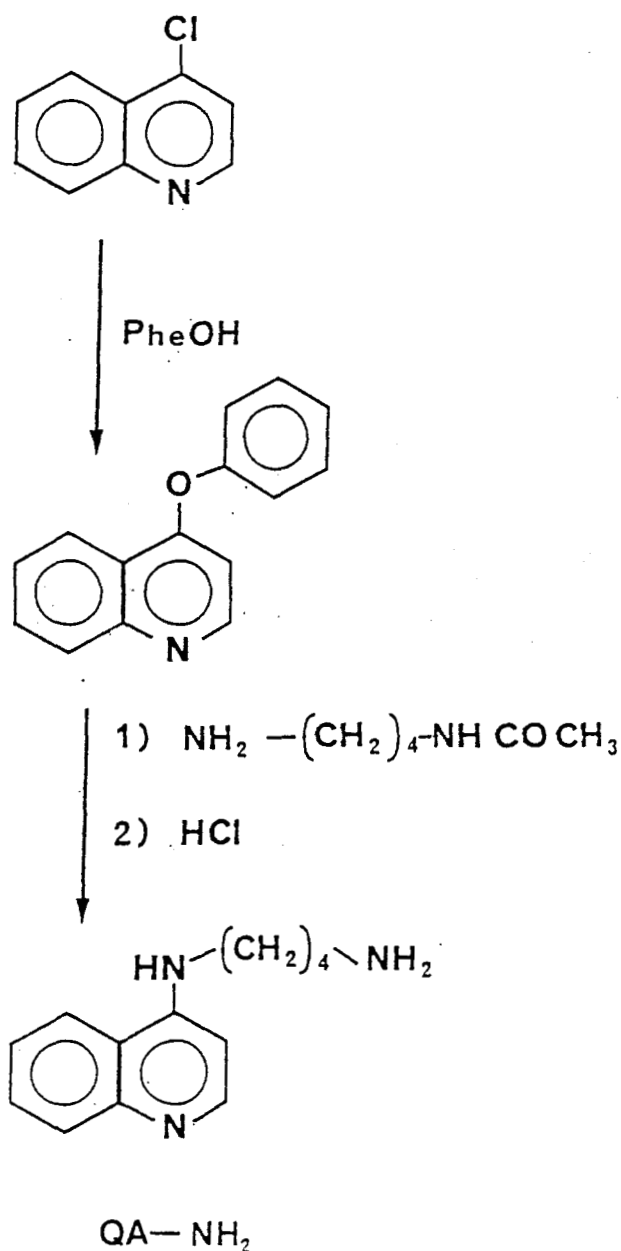
La synthèse chimique de la sonde est réalisée en plusieurs étapes:

*Première étape : Condensation en milieu alcalin du phénol sur la 4-chloroquinoléine aboutissant à la 4-phénoxyquinoléine.

*Deuxième étape : Réaction de substitution du groupement phénol par le monoacétyldiaminobutane. Ce dernier est préparé selon la méthode développée par Tabor et al (41).

*Troisième étape : Hydrolyse en milieu acide du groupement acétyl de la 4-monoacétyldiaminobutane-quinoléine obtenue au terme de la seconde étape. La cristallisation dans le méthanol conduit au dérivé dihydrochloré : QA,2 HCL.

La vérification de la structure obtenue est réalisée en RMN du proton. Les étapes de cette synthèse sont résumées dans le schéma suivant :



Avant d'entreprendre la production d'anticorps polyclonaux dirigés contre cette sonde, nous avons vérifié qu'elle possédait les propriétés requises pour l'étude.

b)-Propriétés biologiques

L'introduction de la fonction amine primaire modifie très peu les pKa des amines basiques des amino-4-quinoléines. A titre d'exemple, le pKa de la fonction amine de l'éthylamine ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-NH}_2$) est de 10,64; il diffère très peu de celui de la triéthylamine ($\text{N-(CH}_3\text{-CH}_2)_3$) dont le pKa est de 10,76. Nous avons

donc considéré que les Pka de la sonde QA étaient très proches de ceux de la chloroquine sans chlore.

Les propriétés antimalariques de la sonde obtenue ont été appréciées à l'aide de deux tests.

***)-Le test des quatre jours.**

Ce test développé par Peters et al (42) donne une évaluation de l'activité antimalarique d'un médicament en indiquant la dose journalière nécessaire à l'inhibition du développement parasitaire pendant une durée de quatre jours. Nous avons réalisé ce test en parallèle pour quatre molécules: la chloroquine (CLQ), la 7-H chloroquinoléine (Q) et leur sonde respective CQA et QA.

Nous utilisons pour ce test une souche possédant un développement rapide sur souris P.yoelii nigeriensis.

Le tableau suivant illustre les résultats obtenus. Nous indiquons la dose efficace nécessaire à l'inhibition de 90% (DE90) du développement de la population parasitaire après quatre jours de traitement.

COMPOSES	CLQ	CQA	Q	QA
Dose efficace à 90 % en $\mu\text{mole/Kg}$	5,8	9,8	83	104

La valeur de DE90 obtenue pour la chloroquine correspond à une dose de 3mg/Kg, ceci étant confirmé par les données publiées par Peters et al (42).

Nous confirmons donc que les amino-4-quinoléines dépourvues de leur chlore en position 7 sont de 10 à 20 fois moins actives que la chloroquine. L'activité de notre sonde QA (100 $\mu\text{moles/Kg}$) et de notre modèle Q sont du même ordre de grandeur.

***)-Le test de coalescence du pigment malarique.**

Ce test proposé par Warhurst (44) permet de visualiser un effet biologique provoqué par des molécules. L'effet se traduit par une coalescence du pigment malarique. Cette coalescence est spécifique des amino-4-quinoléines et est induite par injection in vivo d'une dose unique chez des souris parasitées par *P.berghei* N (parasitémie 20 %).

Contrairement à CLQ et CQA (34), Q et QA sont incapables de provoquer la coalescence du pigment malarique in vivo à des doses de 20 mg/kg.

L'ensemble de ces tests et les données de la littérature nous indiquent que la sonde QA répond aux critères nécessaires à cette étude c'est à dire : QA est une base faible et n'est pas antimalarique. Nous pouvons aborder le problème de l'obtention d'anticorps dirigés contre cette sonde.

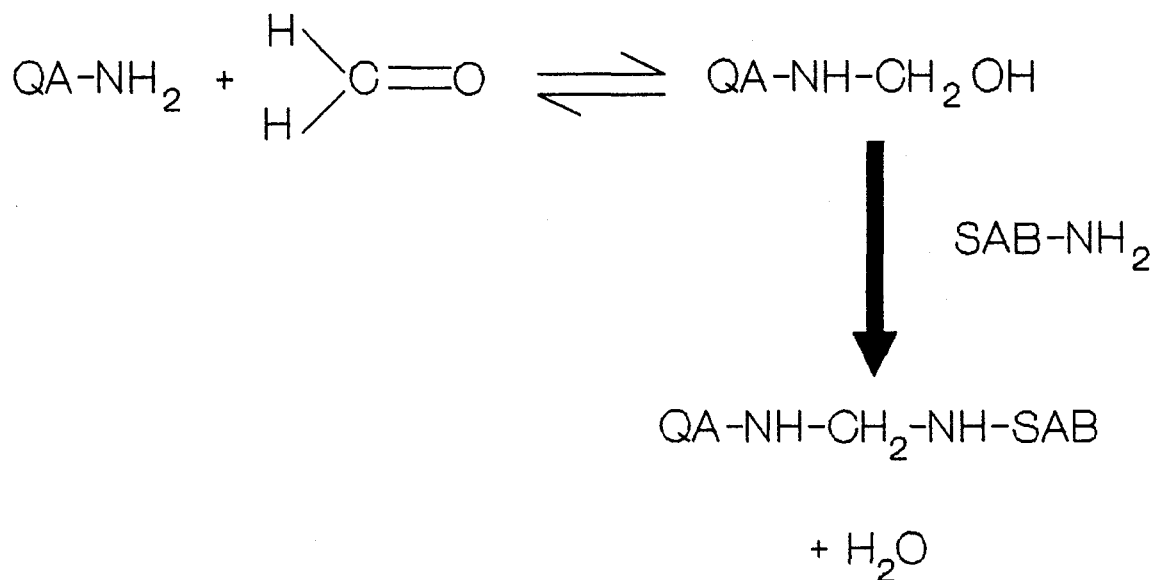
c)-obtention d'anticorps polyclonaux.

Lorsqu'on compare notre modèle Q et la sonde QA synthétisée, la différence majeure entre ces deux molécules réside dans la présence d'une fonction amine primaire sur la chaîne latérale. Cette fonction amine (NH_2) va trouver sa justification dans l'obtention d'un antigène capable d'induire la synthèse d'anticorps spécifiques dirigés contre la sonde. En effet, le faible poids moléculaire de la sonde QA ne lui permet pas d'induire chez l'animal une réaction immunologique conduisant à la synthèse d'anticorps. Par contre, la molécule est un haptène . L'haptène étant généralement une substance de faible poids moléculaire, incapable de susciter à elle seule la formation d'anticorps, mais pouvant réagir avec un anticorps et devenir immunogène par un couplage avec une protéine porteuse.

Après greffage de l'haptène QA par liaison covalente sur une protéine porteuse (sérum albumine de boeuf : SAB), l'injection de ce complexe SAB-QA à un lapin conduit à l'obtention d'une synthèse d'anticorps dont certains sont dirigés contre la sonde. La partie antigénique de la molécule étant le noyau quinoléique.

***)-Synthèse de l'antigène SAB-QA.**

La sonde QA est accrochée sur la sérum albumine bovine par l'intermédiaire de sa fonction amine NH_2 , en utilisant comme agent de greffage un mélange de formol et de glutaraldéhyde. La réaction de greffage (43) est décrite par la figure suivante.



***)-Obtention des anticorps polyclonaux.**

Des lapins sont immunisés par injection du conjugué SAB-QA selon la méthode de Vaitukaitis et al (45).

L'existence d'anticorps spécifiques antiquinoléines dans le sérum de lapin est détectée par une méthode E.L.I.S.A.. La spécificité des anticorps est mesurée toujours selon la méthode E.L.I.S.A. mais en réalisant une compétition entre l'antigène (SAB-QA) et la sonde QA. Le pourcentage d'inhibition reflétant le taux d'anticorps spécifiques de QA.

Avant de relater les résultats concernant l'immunodétection de la sonde QA, nous consacrons le paragraphe suivant au deuxième intérêt de la fonction amine primaire de QA.

***)-Rétention de la sonde QA.**

La fonction amine primaire donne à la sonde qui n'est pas un constituant cellulaire, la possibilité d'être maintenue *in situ* par des agents de fixation (formol et glutaraldéhyde) suivant la même réaction décrite dans le paragraphe précédent. La fixation par une liaison covalente empêche l'élimination de la sonde au cours des nombreux lavages effectués lors de la préparation de l'échantillon pour la microscopie électronique.

De plus, la réticulation par le mélange de fixateur de l'ensemble des structures cellulaires peut conduire à la perte de l'interaction éventuelle entre la sonde QA et un récepteur potentiel. L'antigène QA devenant ainsi accessible à la reconnaissance par l'anticorps. Le complexe antigène-anticorps est retenu par l'intermédiaire de QA et pourra donc être détecté *in situ*.

d)-Localisation intraparasitaire de la sonde QA.

L'immunodétection de la sonde QA a été effectuée chez deux souches d'un Plasmodium murin.

-Plasmodium berghei N (Normal, sensible à la chloroquine).

-Plasmodium berghei RC (résistant à la chloroquine).

***)-P.berghei N**

Des souris sont infestées par une dose de 10^8 hématies parasitées et selon la voie intrapéritonéale. Quand la parasitémie atteint environ 30 %, les souris reçoivent une dose unique (20 mg/kg) de la sonde QA. Trente minutes plus tard, le sang est prélevé par ponction dans la cavité sous brachiale et est fixé par un mélange formaldéhyde-glutaraldéhyde. Après imprégnation dans le cryoprotecteur (glycérol, DMSO), les échantillons sont congelés dans l'azote. Les coupes ultrafines sont réalisées à -100°C sur un ultracryotome. L'immunodétection sur coupe de la sonde QA est réalisée par l'intermédiaire des anticorps (de lapin) spécifiques. L'immun complexe (antigène-anticorps) étant révélé par l'utilisation de la protéine A-gold. L'or étant opaque aux

électrons, la visualisation de la sonde se traduit par des points noirs (grains d'or) sur les photographies de microscopie électronique.

Chez P.berghei N, la localisation intraparasitaire de la sonde QA (7-H quinoléine) est identique à celle de la sonde CQA (analogue chloroquine) obtenue précédemment dans notre laboratoire (34). Les sondes QA et CQA se concentrent dans les vacuoles digestives où la dégradation de l'hémoglobine est effective (46,1), (planche II).

***)-P.berghei RC.**

La dispersion de la sonde QA dans l'ensemble du cytoplasme est identique à la localisation de la sonde CQA déjà observée dans notre laboratoire (planche II).

La deuxième étape de cette analyse consiste à déterminer en quelles quantités se concentrent ces deux molécules : chloroquine et chloroquine sans chlore.

2)-Détermination des quantités de sondes accumulées chez P.berghei N.

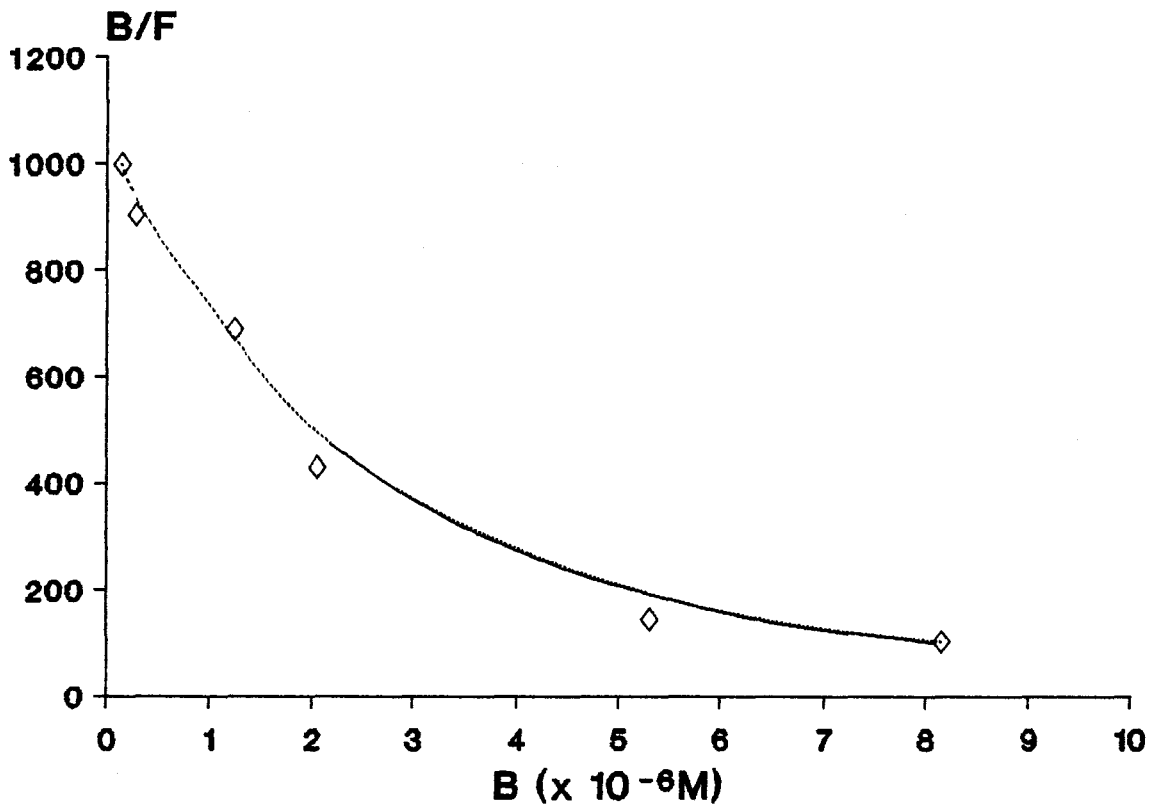
Pour la mesure de la constante d'affinité de la chloroquine pour le parasite nous disposons de chloroquine radiomarkuée (H^3 chloroquine). Par contre, la mesure de la constante d'affinité de la chloroquine sans chlore n'était pas accessible directement car nous ne possédions pas la molécule radiomarkuée. Nous avons donc utilisé une méthode de mesure de la constante d'affinité indirecte qui consiste en une inhibition de l'incorporation de la chloroquine tritiée par la chloroquine sans chlore.

a)-Mesure de la constante d'affinité du complexe CLQ-P.berghei

Des hématies parasitées par P.berghei N sont incubées pendant une heure en présence de différentes concentrations de chloroquine. La quantité totale de chloroquine incorporée est déterminée par la mesure de la radioactivité

présente dans le culot parasitaire à l'aide d'un compteur à scintillation liquide.

Les résultats sont exploités à l'aide de la représentation de scatchard. Cette représentation montre la variation du rapport chloroquine intraparasitaire sur la chloroquine extracellulaire ($B = \text{bound}(\text{lié}) / F = \text{free}(\text{libre})$) en fonction de la chloroquine intraparasitaire (B).



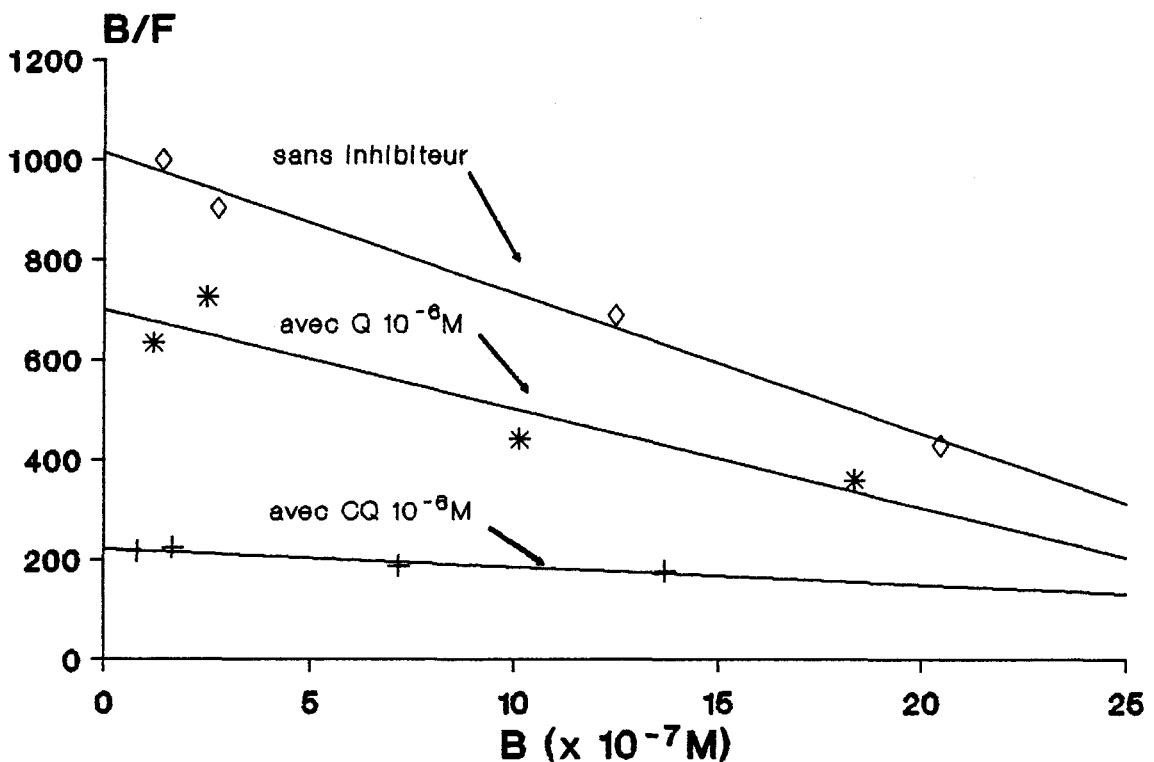
La pente de la tangente à la courbe (partie en pointillé) au point d'intersection avec l'axe des ordonnées représente la constante d'affinité entre le parasite P.berghei N et la chloroquine. Nous avons décidé de nous intéresser uniquement à cette constante d'affinité ($K_a = 2,7 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$) car sa valeur correspond aux données de la littérature (47). Le but de cette approche n'est pas d'étudier les caractéristiques du ou des "récepteurs" (ni de déterminer leur nombre) du parasite pour la chloroquine mais de mettre au

point une méthode reproductible permettant d'analyser l'influence de certains inhibiteurs sur l'interaction préférentielle (à faibles concentrations) entre la chloroquine et le parasite.

Ayant mis au point cette méthode, nous avons réalisé des mesures de constante d'inhibition pour ce site de haute affinité par différentes molécules CLQ, Q, QA, CQA.

b)-Mesure des constantes d'inhibition.

La différence avec la méthode employée ci-dessus, réside dans l'incubation des hématies parasitées en présence de l'inhibiteur 15 minutes avant le début de l'incorporation de la chloroquine tritiée. L'incorporation de la chloroquine étant réalisée en présence de l'inhibiteur. Le scatchard suivant illustre les courbes obtenues en présence et en absence d'inhibiteur.

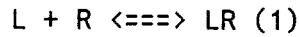


Les pentes des droites obtenues en présence d'inhibiteur sur ce graphe nous donnent la constante d'affinité apparente (K_{Dapp}) de la drogue pour la classe de récepteur.

Le paragraphe suivant est consacré aux calculs permettant d'obtenir la constante d'inhibition K_{di} de l'inhibiteur pour le site d'affinité.

***)-Calcul de la constante d'inhibition.**

L'interaction protéine-ligand est représentée par la réaction générale.



la constante de dissociation étant : $K_D = \frac{[L][R]}{[LR]} \quad (2)$

En présence d'un inhibiteur compétitif on a une deuxième réaction :



Pour l'étude de l'interaction protéine-ligand, on prend habituellement les conventions suivantes :

$[LR] = B$ (bound) représente la concentration du complexe ligand-récepteur.

$[L] = F$ (free) représente la concentration du ligand non lié au récepteur, c'est à dire libre.

$[I] = Fi$ représente la concentration de l'inhibiteur non lié au récepteur.

$[IR] = Bi$ représente la concentration du complexe inhibiteur-récepteur.

$[Rt] = B_{max}$ représente la concentration totale du récepteur. C'est la valeur maximale de la concentration du complexe ligand-récepteur.

Les égalités 2 et 4 s'écrivent donc :

$$K_D = \frac{F R}{B} \quad (2') \quad K_{Di} = \frac{Fi R}{Bi} \quad (4')$$

La loi de la conservation de la matière permet d'écrire

$$[Rt] = [R] + [IR] + [LR]$$

autrement exprimé : $B_{max} = [R] + Bi + B$ d'où $R = B_{max} - Bi - B \quad (5)$

Les équations 2' et 4' permettent d'écrire (R étant constant) :

$$\frac{K_{Di} Bi}{Fi} = \frac{K_D B}{F}$$

d'où

$$Bi = \frac{K_D B Fi}{F K_{D1}} = B \frac{K_D}{F} \frac{Fi}{K_{D1}} \quad (6)$$

Les équations 2' et 5 nous donnent :

$$K_D = \frac{F (Bmax - Bi - B)}{B}$$

En remplaçant Bi par sa valeur déterminée à l'aide de l'équation 6 :

$$K_D = \frac{F \left[Bmax - B - \left(B \frac{K_D}{F} \frac{Fi}{K_{D1}} \right) \right]}{B} \quad \Longleftrightarrow$$

$$\frac{B K_D}{F} = Bmax - B - \left(B \frac{K_D}{F} \frac{Fi}{K_{D1}} \right) \quad \Longleftrightarrow$$

$$Bmax = B \left[\frac{K_D}{F} + 1 + \left(\frac{K_D}{F} \frac{Fi}{K_{D1}} \right) \right] \quad \Longleftrightarrow$$

$$Bmax = B \left[1 + \frac{K_D}{F} \left(1 + \frac{Fi}{K_{D1}} \right) \right] \quad \Longleftrightarrow$$

$$B = \frac{Bmax F}{1 + \frac{K_D}{F} \left(1 + \frac{Fi}{K_{D1}} \right)} \quad \Longleftrightarrow$$

$$B = \frac{Bmax F}{F + \left[K_D \left(1 + \frac{Fi}{K_{D1}} \right) \right]} \quad (7)$$

Sans la présence d'inhibiteur et par un raisonnement analogue on obtient l'équation suivante:

$$B = \frac{Bmax F}{(F + K_D)} \quad (8)$$

Donc en présence d'inhibiteur, la constante de dissociation du ligand est remplacée par une constante de dissociation apparente K_{Dapp} (déterminée graphiquement). D'après les équations 7 et 8 :

$$K_{Dapp} = K_D \left(1 + \frac{Fi}{K_{DI}} \right) \quad (9)$$

La constante de dissociation apparente est donc déterminée graphiquement à partir de la courbe obtenue en présence d'inhibiteur. Le problème est donc de calculer K_{DI} . K_{DI} étant la constante de dissociation entre le récepteur et l'inhibiteur. Pour cela, il est nécessaire de travailler à une concentration en inhibiteur très élevée par rapport à la concentration en récepteur.

$It \gg Rt$ dans ce cas $Bi \ll It$ alors $Fi = It - Bi \approx It$

d'où d'après l'équation 9 :

$$K_{Dapp} = K_D \left(1 + \frac{It}{K_{DI}} \right) \iff \frac{K_{Dapp}}{K_D} = 1 + \frac{It}{K_{DI}}$$

$$K_{DI} = \frac{It}{\frac{K_{Dapp}}{K_D} - 1} = \frac{It K_D}{K_{Dapp} - K_D}$$

K_D est déterminé graphiquement (courbe sans inhibiteur).

K_{Dapp} est déterminé graphiquement (courbe en présence d'inhibiteur).

It représente la concentration en inhibiteur. Elle est donc parfaitement connue. Par le calcul précédent, on détermine K_{DI} .

Nous avons donc réalisé ce type d'expérience avec comme inhibiteurs quatre molécules : Q, QA, CQA, CQ. Le tableau suivant regroupe les valeurs de K_{Di} obtenues avec la souche P.berghei N.

Quinoleines	CQ	CQA	Q	QA
K_{Di} en M	$1,4 \cdot 10^{-7}$	$1,7 \cdot 10^{-7}$	$3,3 \cdot 10^{-6}$	$7 \cdot 10^{-6}$
K_{Di}/K_{DiCQ}	1	1,2	23	50

Le rapport K_{Di}/K_{DiCQ} indique dans quelle proportion relative se concentrent les inhibiteurs. Lorsque le rapport K_{DiQ}/K_{DiCQ} est de 20, cela signifie qu'à concentration égale, la chloroquine sans chlore se concentre 20 fois moins que la chloroquine.

On peut émettre la critique suivante concernant le calcul des K_{Di} car la concentration R_t n'est pas négligeable par rapport à la concentration 10^{-6} M en inhibiteur que nous avons utilisé. Néanmoins, si la valeur absolue des K_{Di} n'est pas exacte, leur comparaison est valable puisque les expériences sont réalisées dans les mêmes conditions et avec des concentrations en inhibiteurs identiques. De plus, la concentration de 10^{-6} M, nous est pratiquement imposée, car des concentrations supérieures en chloroquine perturberaient notablement et rapidement le métabolisme parasitaire, entraînant des difficultés supplémentaires pour obtenir des résultats exploitables.

c)-Conclusion

Nous avons pour but de séparer les propriétés de base faible des amino-4-quinoléines de leurs propriétés antimalariques. A la lumière des résultats obtenus, on constate que les propriétés de base faible suffisent pour cibler la vacuole digestive du parasite comme proposé dans l'hypothèse d'un mécanisme

lysosomotrope. Par contre, elles sont incapables de justifier en quantité la forte incorporation de chloroquine comparée à la chloroquine sans chlore. Ce résultat est d'autant plus surprenant que dans un mécanisme purement lysosomotrope, la chloroquine sans chlore aurait dû être accumulée en quantité plus importante que la chloroquine.

Cette approche a donc permis de souligner l'importance des caractères structuraux de la chloroquine (en particulier le chlore en position 7) dans le mécanisme de concentration intraparasitaire. Néanmoins, ce type d'approche ne nous permet pas de caractériser d'autres paramètres pouvant intervenir dans cette sélectivité parasitaire.

C)-ANALYSE CINETIQUE.

1)-Introduction.

L'idée d'une analyse cinétique de la pénétration de bases faibles chez le Plasmodium trouve son origine dans une étude bibliographique concernant les dernières hypothèses tentant de rendre compte de la sélectivité de la chloroquine vis à vis du parasite.

Les résultats obtenus avec la chloroquine sans chlore démontrent l'intervention dans le mécanisme de concentration intraparasitaire de la chloroquine de caractéristiques structurales non liées à ses propriétés de base faible. Le terme de "non weak bases properties" a été proposé par Krosgtad (33) mais n'a jamais été étayé par une approche expérimentale. Dès 1986, Warhurst (48) propose l'intervention d'une perméase dans le processus de concentration des antimalariques tels que la chloroquine ou la quinine. Un des arguments développé par cet auteur pour appuyer la nécessité d'une perméase repose sur des mesures de pH intracellulaires. Ces mesures de pH effectuées chez P.chabaudi (49) indiquent un pH de 6,6 pour le cytoplasme du globule rouge et de 7,6 pour celui du parasite. Dans ce cas, l'inversion du gradient de pH (le pH cytoplasmique parasite est plus basique que le pH de l'érythrocyte) rend difficile l'accumulation de la chloroquine suivant un mécanisme de concentration lysosomotrope. D'où l'obligation d'une structure permettant le passage des drogues dans le cytolasme parasite contre le gradient de protons.

Dans le domaine de la résistance aux antimalariques, chez Plasmodium falciparum (souche humaine) est apparu récemment un nouveau concept. Le mécanisme proposé s'apparente aux phénomènes de polychimiorésistance des cellules cancéreuses. Certaines cellules cancéreuses possèdent dans leurs membranes, une p-glycoprotéine capable de rejeter dans le milieu extracellulaire de nombreux anticancéreux, diminuant ainsi leur efficacité. Des chercheurs (50, 51) ont mis en évidence un analogue du gène codant pour la p-glycoprotéine chez des souches de P.falciparum. Dans l'état actuel des

recherches, la corrélation entre la présence du gène et la résistance à la chloroquine fait encore l'objet de controverse (52, 53). La localisation de la protéine dans le Plasmodium n'a pas été réalisée pour l'instant. La réalisation de cet objectif pourrait éclaircir l'ensemble des résultats obtenus.

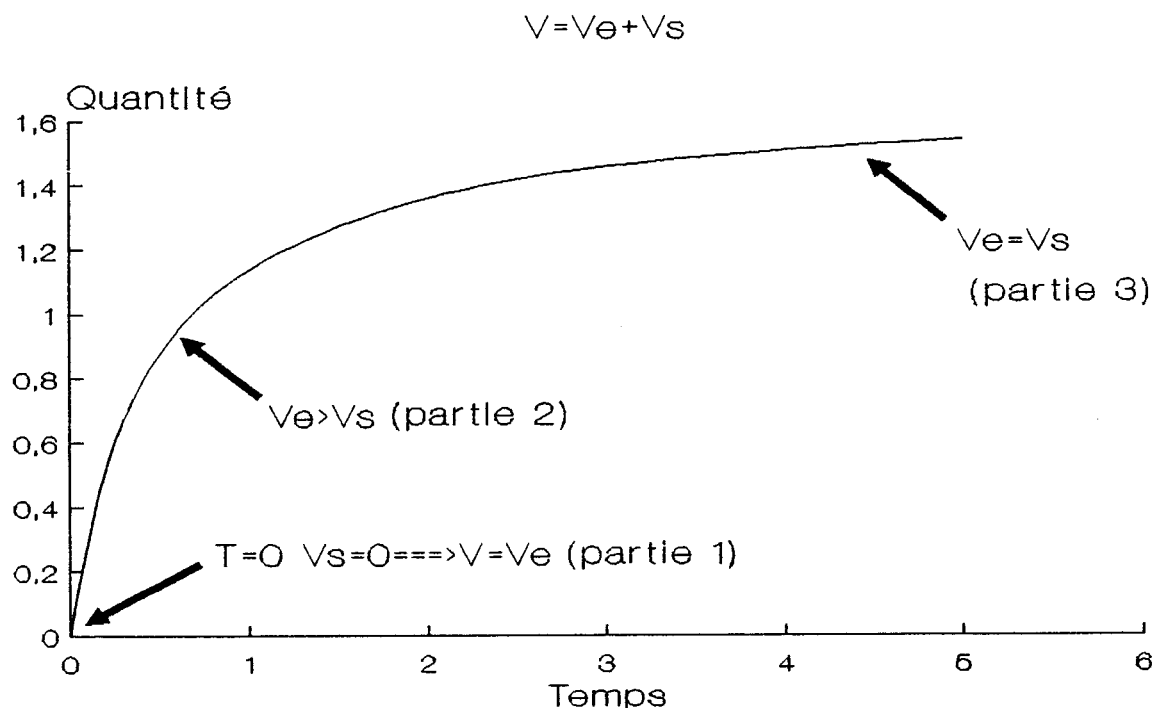
Le développement de ces nouvelles hypothèses (perméase ou MDR), nous a conduit à envisager d'étudier le phénomène de concentration des amino-4-quinolines en terme d'analyse cinétique.

2)-Définition d'une cinétique

L'analyse des vitesses initiales devrait permettre la caractérisation des modes de transport membranaire des bases faibles au niveau de l'hématie parasitée par P.berghei N.

Pour appréhender l'intérêt des mesures de vitesses initiales d'une molécule dans un système biologique tel que la membrane, nous allons décrire succinctement les différentes phases intervenant dans une cinétique d'incorporation.

Tout d'abord une cinétique d'incorporation se définit par l'étude de la quantité incorporée d'une molécule dans un système biologique en fonction du temps. Le schéma suivant montre les différentes phases d'une cinétique.



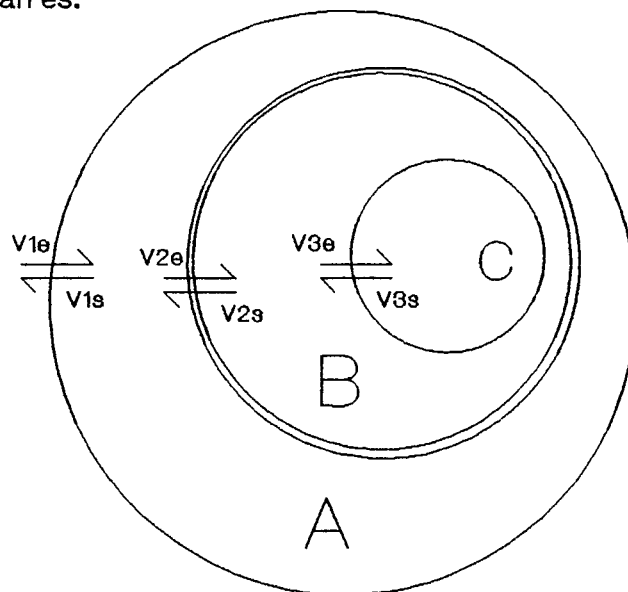
A chaque instant la vitesse instantanée V mesurée est la somme algébrique de deux vitesses: $V = V_e + V_s$

V_e correspond à la vitesse de pénétration de la molécule dans le système biologique.

V_s est la vitesse de sortie de la molécule du système biologique vers le milieu extérieur. Le graphe (schéma précédent) se décompose en trois parties remarquables. La partie 1 correspond à la vitesse initiale : le temps est voisin de zéro ($t \rightarrow 0$), la vitesse V_s est nulle puisqu'il n'y a pas de molécule à l'intérieur du compartiment. $V(t \rightarrow 0) = V_e + 0 (V_s) = V_i$. La vitesse V_e au temps zéro prend alors le nom de vitesse initiale V_i . Elle correspond, d'un point de vue mathématique, à la tangente à la courbe de cinétique au temps zéro autrement exprimée par la dérivée première au temps zéro de la fonction décrivant la courbe de cinétique.

Au cours de la partie 2, l'accumulation du composé est due à V_e supérieure à V_s . Enfin la partie 3 du graphe représente l'équilibre du système, V_e est égale à V_s .

Avant de présenter les résultats, nous allons préciser la nature exacte de la vitesse mesurée. La chloroquine doit franchir plusieurs membranes pour atteindre la vacuole digestive. Le schéma suivant représente le Plasmodium avec les différentes vitesses de passage de la chloroquine au niveau des systèmes membranaires.



L'hématie parasitée se compose de trois compartiments : A (stroma érythrocytaire), B (cytoplasme parasitaire) et C (vacuole digestive). A chaque instant, la quantité de chloroquine dans un compartiment est égale à la quantité qui pénètre dans ce compartiment (c'est à dire la vitesse d'entrée (quantité par unité de temps) moins la quantité qui en sort. Prenons l'exemple du compartiment A : la quantité de chloroquine QA est égale :

$$QA = V1e - V1s + V2s - V2e$$

de la même façon:

$$QB = V2e - V2s + V3s - V3e \text{ et } QC = V3e - V3s$$

Or nous mesurons la quantité incorporée dans l'hématie parasitée c'est à dire

$$\begin{aligned} QA + QB + QC &= V1e - V1s + V2s - V2e + V2e - V2s + V3s - V3e + V3e - V3s \\ &= V1e - V1s \end{aligned}$$

Nous mesurons donc la vitesse V1e (vitesse de pénétration dans la membrane du globule rouge) (V1s étant égale à zéro car nous travaillons en vitesse initiale). Nous ne pouvons donc pas, dans les conditions de mesure, avoir accès aux vitesses de franchissement des molécules des autres systèmes membranaires

Nous nous sommes intéressés dans le cas des bases faibles à leur vitesse initiale de pénétration à l'intérieur tant sur hématie saine que parasitée. Pour cette étude, nous avons envisagé une méthode comparative entre deux molécules. Il s'agit de deux bases faibles radiomarquées : le DAMP et la chloroquine.

Le DAMP étant une base faible non antimalarique.

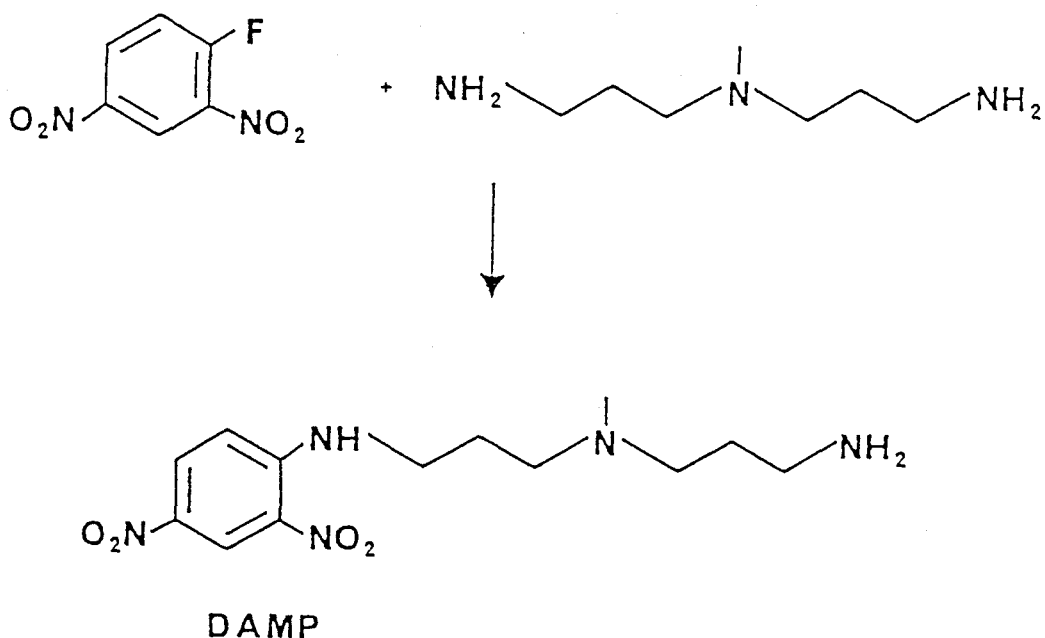
La chloroquine étant une base faible antimalarique.

3)-Mesure de la vitesse initiale d'incorporation du DAMP dans l'hématie saine et parasitée.

Notre premier travail a consisté en la synthèse du DAMP radioactif.

a)-Synthèse du DAMP radioactif

La synthèse du DAMP réalisée d'après Anderson et al (35) consiste en la condensation de la N diamino-3,3' méthylidipropylamine et du 1-fluoro-2,4-dinitro [3,5-³H] benzène.



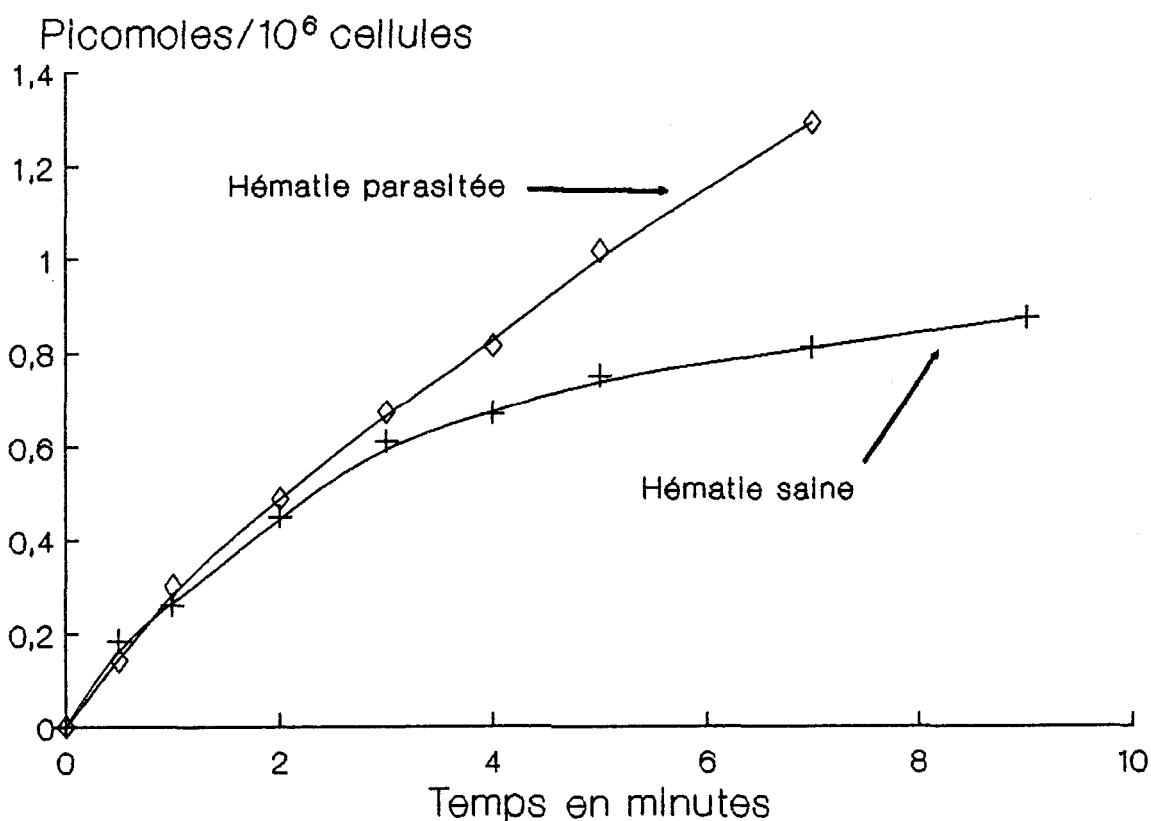
Le produit obtenu est purifié par chromatographie sur silice et cristallisé dans le méthanol sous forme de chlorhydrate. L'activité spécifique de la solution de DAMP obtenue est de 41,8 mCi/mmeole.

b)-Cinétique de concentration du DAMP sur hématie saine et parasitée.

Le départ de l'incorporation du DAMP est donné par l'addition d'une solution d'hématies saines ou parasitées dans un volume de PBS glucosé (2g/l) thermorégulé à 25°C, maintenu à un pH de 7,4 et contenant le mélange de DAMP tritié et froid (non marqué) à la concentration choisie. L'incorporation est bloquée en jetant le tube sur un grand volume de PBS glacé. Après

centrifugation, le culot parasitaire est traité de façon à pouvoir être quantifié dans un compteur à scintillation liquide.

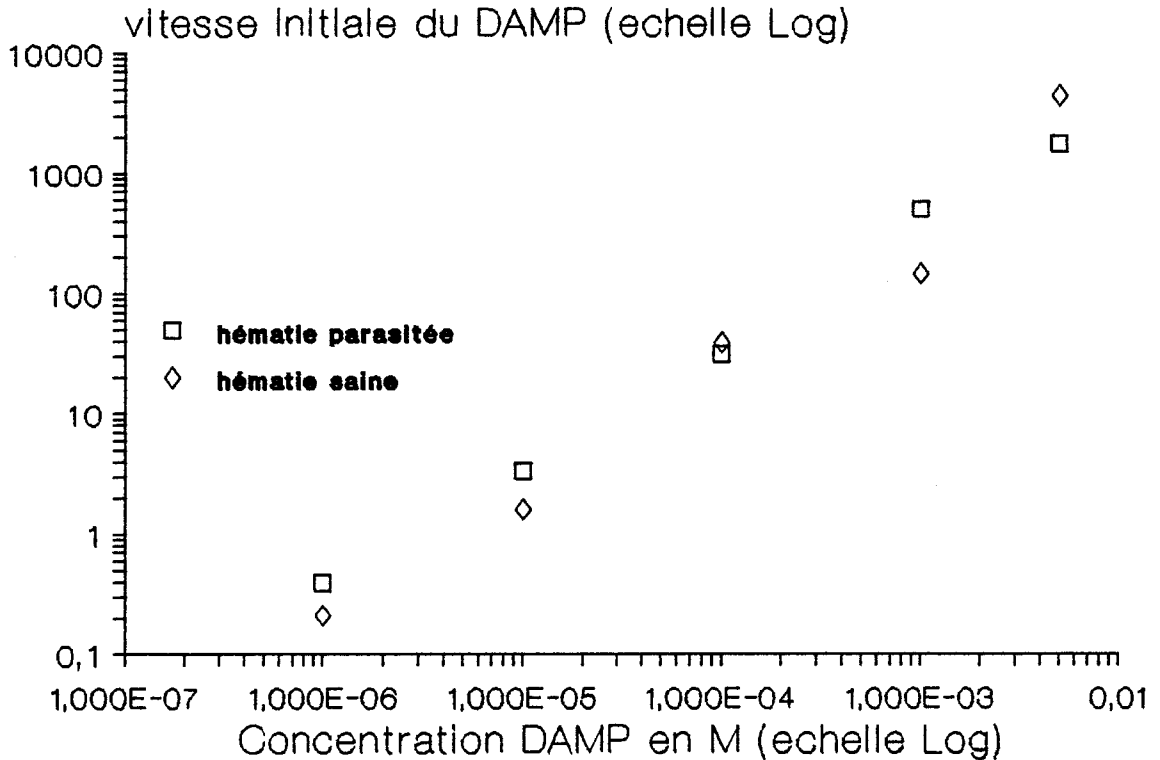
Les résultats obtenus sont exprimés par un graphe représentant la quantité de DAMP incorporée exprimée en picomoles pour 10^6 cellules (soit hématies saines, soit érythrocytes parasités par *P.berghei* N) en fonction du temps. Les courbes de cinétique sont obtenues par l'intermédiaire d'une fonction polynomiale dont les paramètres sont déterminés par régression non linéaire. La vitesse initiale est déterminée soit graphiquement en traçant la tangente à la courbe au point zéro (temps = 0 seconde), soit en dérivant l'équation de la courbe en ce même point.



Ces cinétiques sont réalisées à 25°C, pH 7,4 et dans du PBS glucosé (2 g/l) contenant du DAMP à la concentration de 10^{-6} M. La vitesse initiale sur hématies saines est de $0,39 \pm 0,06$ picomole/ 10^6 cellules/mn et de $0,42 \pm 0,06$ picomole/ 10^6 cellules/mn sur hématies parasitées.

D'après ces premières cinétiques, nous constatons que le DAMP présente des vitesses initiales d'incorporation identiques pour les hématies saines et parasitées.

Nous avons ensuite étudié la variation de la vitesse initiale en fonction de la concentration en DAMP dans le milieu extérieur. Le graphe ci-dessous montre les variations des vitesses initiales du DAMP en fonction de la concentration chez l'érythrocyte sain et parasité par *P.berghei*.



On constate l'existence d'une relation linéaire entre la variation des concentrations et la vitesse initiale. Dans la gamme de concentration utilisée, on n'observe donc pas pour le DAMP, un phénomène de saturation caractéristique d'un transporteur.

La variation linéaire de la vitesse initiale en fonction de la concentration et des vitesses identiques de pénétration chez l'hématie saine et parasitée sont des éléments en faveur d'une diffusion du DAMP pour la pénétration dans l'hématie.

c)-Cinétique de concentration de la chloroquine sur hématies saines et hématies parasitées.

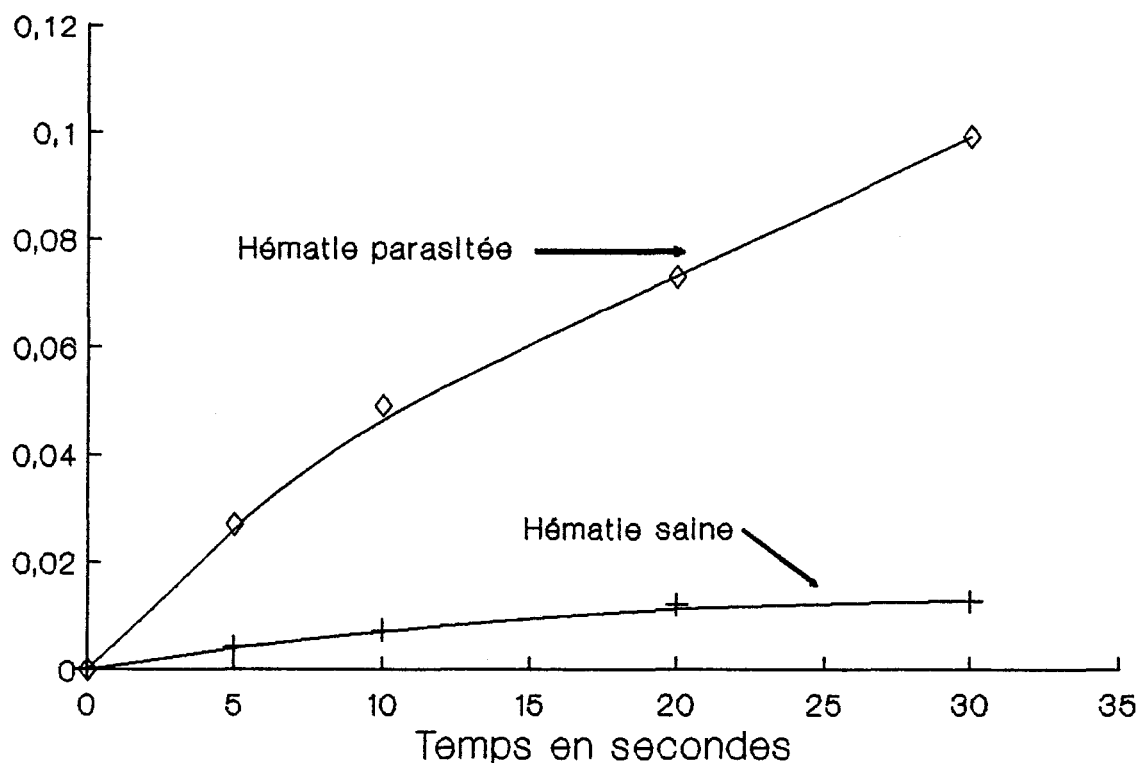
Des difficultés pour mesurer la vitesse initiale d'incorporation de la chloroquine sur hématies saines sont survenues. La méthode utilisée pour le DAMP s'est avérée applicable à la détermination de la vitesse initiale de la chloroquine sur hématie parasitée mais non valable pour le globule rouge sain.

Il s'est avéré nécessaire de mettre au point une nouvelle méthode. L'incubation est réalisée dans un tube Eppendorf dans lequel on a déposé du phtalate de butyle. Le départ de l'incorporation est donné par la mise en contact d'une solution mère d'hématies avec le PBS glucosé (2g/l) à 25°C, pH 7,4 et contenant le mélange de chloroquine froide et radiomarquée. L'incorporation de la chloroquine est stoppée par une centrifugation à 12000 g pendant 5 secondes. Cette centrifugation permet le passage des cellules à travers la couche de phtalate de butyle. De ce fait les hématies sont séparées du milieu contenant la chloroquine. Nous réalisons les mêmes expériences à 4°C, pour obtenir la quantité de chloroquine adsorbée non spécifiquement à la surface des hématies mais aussi celle contenue dans le volume intercellulaire entraîné par les hématies lors de la centrifugation.

Le mode de représentation graphique et le calcul de la vitesse initiale sont identiques à ceux employés pour la cinétique du DAMP.

Le graphe de la page suivante représente les cinétiques d'incorporation de la chloroquine chez des hématies saines et parasitées par P.berghei.

picomoles/ 10^6 cellules



Ces cinétiques sont réalisées à 25°C, pH 7,4 et dans du PBS glucosé (2 g/l) contenant de la chloroquine à la concentration de 10^{-4} M. La vitesse initiale sur hématies saines est de $0,06 \pm 0,018$ picomole/ 10^6 cellules/mn et de $0,37 \pm 0,06$ picomole/ 10^6 cellules/mn pour les hématies parasitées.

Comme pour l'incorporation du DAMP, la chloroquine se concentre en plus grande quantité dans les hématies parasitées. Par contre un phénomène important se dégage de cette simple manipulation, il semble exister une différence de vitesse initiale d'incorporation de la chloroquine entre l'hématie infectée par le Plasmodium et la cellule saine. La vitesse initiale trouvée pour le globule rouge parasité est en moyenne dix fois plus élevée que celle de l'érythrocyte sain.

Il ne nous a pas été possible d'étudier l'influence de la concentration en chloroquine sur la vitesse initiale. En effet, la vitesse initiale étant très rapide, nous ne pouvons pas obtenir, pour des concentrations supérieures à 10^{-4} M, un minimum de variation linéaire entre deux temps très courts consécutifs permettant de calculer la vitesse initiale. Une technique capable de déterminer la quantité de chloroquine incorporée après 3s d'incubation serait

nécessaire. Néanmoins, nous observons une linéarité de la vitesse initiale en fonction de la concentration jusqu'à 10^{-4} M en chloroquine extracellulaire.

Nous avons donc envisagé un autre moyen afin de déterminer si l'augmentation de la vitesse initiale de la chloroquine obtenue chez P.berghei N était due à la présence d'un transporteur. Un transporteur peut être inhibé soit par des inhibiteurs compétitifs, soit en le privant d'énergie dans un cas de transport actif.

d)-Essais d'inhibition de la vitesse initiale

Pour ces expériences, nous avons essayé des inhibiteurs de vitesses initiales de la chloroquine et du DAMP uniquement sur Plasmodium berghei N.

Les mesures de vitesses initiales ont été faites en utilisant la méthode d'incubation du DAMP. Les seules modifications consistent à incuber la solution mère d'hématies parasitées avec l'inhibiteur 15 minutes minimum avant le départ de l'incorporation et de réaliser celle-ci toujours en présence de l'inhibiteur. Le tableau suivant fait état des différents inhibiteurs utilisés et leur influence sur les vitesses initiales (V_i) du DAMP et de la chloroquine (CLQ) dans l'hématie parasitée.

Inhibiteurs	VI DAMP	Inhibition	VI CLQ	Inhibition
sans inhibiteur	$0,42 \pm 0,06$	pas d'inhibition	$0,37 \pm 0,06$	pas d'inhibition
NaF 5×10^{-3} M KCN 5×10^{-4} M	0,34	Pas d'inhibition	0,5	pas d'inhibition
sans glucose	0,48	pas d'inhibition	0,5	pas d'inhibition
sans glucose antimycine A 8×10^{-4} M roténone 8×10^{-4} M	non déterminée	pas d'inhibition	0,36	pas d'inhibition
FCCP 2×10^{-4} M	0,5	pas d'inhibition	0,38	pas d'inhibition
phlorétine 10^{-4} M	non déterminée	non déterminée	0,39	pas d'inhibition

NB : la concentration en DAMP dans le milieu extérieur est de 10^{-6} M. La concentration en chloroquine est de 10^{-7} M. Les écarts-types sont calculés à partir de 10 cinétiques indépendantes.

Avant de discuter ces résultats, nous allons décrire le rôle de ces différents inhibiteurs.

Le mélange fluorure de sodium (NaF) et cyanure de potassium (KCN) : ces deux inhibiteurs ont été employés afin de priver l'hématie parasitée en énergie. NaF inhibe la dégradation du glucose par la voie de la glycolyse. La glycolyse étant la principale source d'énergie de l'érythrocyte. Le cyanure de potassium a pour rôle d'inhiber les chaînes d'oxydation cellulaire du parasite, en particulier la cytochrome oxydase, et donc de priver en énergie (diminution de la production d'ATP). Néanmoins, des auteurs (54) ont démontré que l'inhibition de la cytochrome oxydase par le KCN ne prive le P. berghei N que de 20% de sa production totale en énergie. Nous avons donc essayé deux inhibiteurs la roténone et l'antimycine A. Ces inhibiteurs agissent sur différentes étapes de la chaîne d'oxydation cellulaire.

La combinaison de ces deux inhibiteurs (antimycine A et roténone) associée à une incubation dans un milieu dépourvu de glucose prive quasi totalement le parasite en énergie.

Nous avons étudié un autre type d'inhibiteur : le FCCP (Carbonylcyanide-p-trifluorophénylhydrazone). Le FCCP est un acide faible ayant la propriété de rendre les membranes perméables aux protons. Il joue le rôle de transporteur mobile de protons au travers de la bicouche lipidique. Il va égaliser les concentrations en protons de part et d'autre d'une membrane et supprime par conséquent le gradient de protons. Ceci permet donc d'étudier l'influence du gradient de protons sur la vitesse initiale d'incorporation des bases faibles dans l'hématie parasitée.

L'utilisation de la phlorétine [β -(4-hydroxyphényl)-2,4,6-trihydroxypropiophénone] a pour but de déterminer si l'augmentation de la vitesse initiale de la chloroquine sur l'hématie parasitée n'est pas liée à l'existence d'une perméabilité particulière de la membrane de l'érythrocyte infesté. En effet, une perméabilité spécifique de la membrane du globule rouge parasité a été mise en évidence (55). Le parasite modifie la perméabilité de

cette membrane pour subvenir à ses besoins croissants en sucre et en acides aminés nécessaires à son développement. Il nous est donc apparu intéressant de déterminer si la différence de vitesse initiale de la chloroquine entre l'hématie saine et parasitée ne trouve pas son origine dans le passage de la chloroquine au travers de ces pores. La phlorétine étant connue pour inhiber la pénétration de substances par l'intermédiaire de ces pores (56).

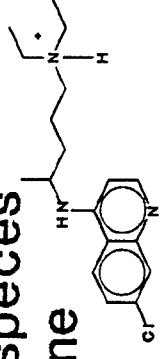
Nous constatons qu'aucune des tentatives d'inhibition de la vitesse initiale, que ce soit du DAMP ou de la chloroquine ait été positive. Par contre, pour la chloroquine comme pour le DAMP, nous observons une diminution de la quantité accumulée sous l'influence de ces inhibiteurs. Cette diminution de la quantité incorporée nous indique que les concentrations de l'inhibiteur utilisé perturbent le métabolisme parasitaire.

Concernant le DAMP, les résultats d'inhibition de la vitesse initiale convergent et confirment le transport par diffusion passive déjà mis en évidence lors de l'étude sur la variation de vitesse initiale en fonction de la concentration.

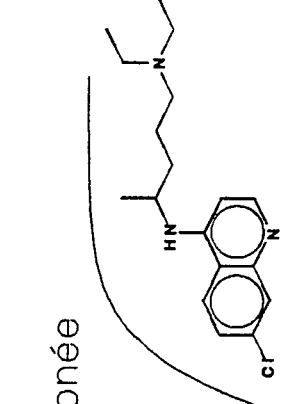
Pour la chloroquine, nous vérifions un fait expérimental mis en évidence par de nombreux travaux, c'est à dire une dépendance énergétique et la nécessité d'un gradient de protons pour l'accumulation intraparasitaire de la chloroquine. Par contre la vitesse initiale sur l'hématie parasitée semble indépendante de ces paramètres. L'indépendance d'un point de vue énergétique de la vitesse initiale d'incorporation de la chloroquine sur l'hématie parasitée a déjà été relatée (57). L'augmentation de vitesse initiale observée chez l'érythrocyte parasité par P.berghei N par rapport à l'hématie saine ne semble pas lié à une consommation d'énergie, ni à l'existence du gradient de protons ni à la perméabilité spécifique (présence de structure membranaire de type pore) de la membrane de l'érythrocyte parasité.

Par contre cette différence pourrait trouver son origine dans le fait qu'au pH physiologique la chloroquine existe sous trois formes. Les proportions

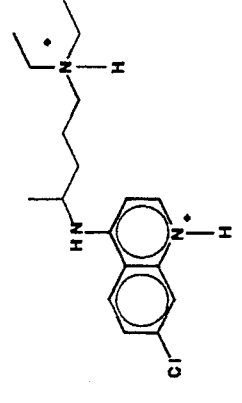
Influence du pH sur les espèces chimiques de la chloroquine



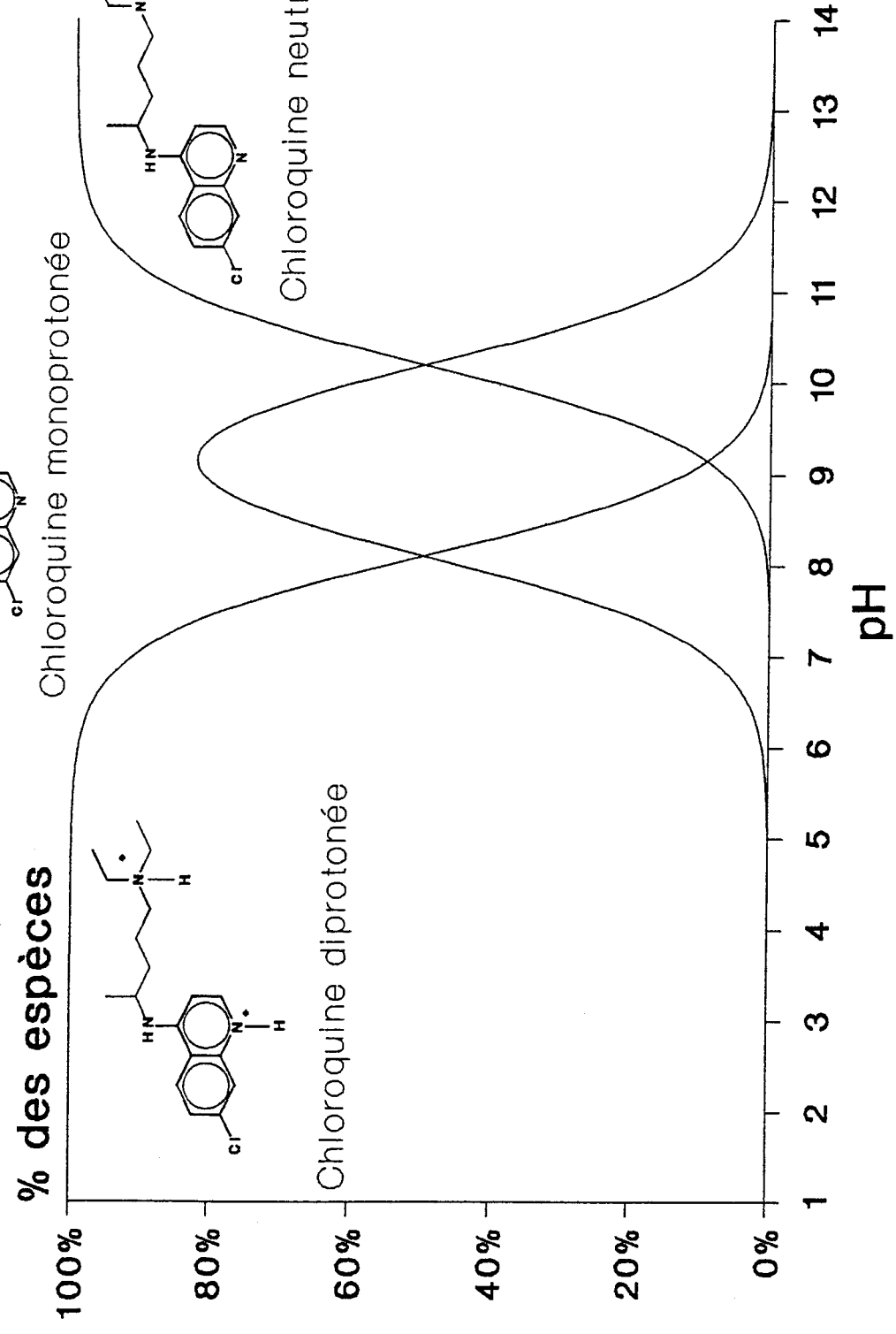
Chloroquine monoprotonnée



Chloroquine neutre



Chloroquine diprotonnée



de ces formes étant très différentes, une perméabilité sélective de la membrane de l'érythrocyte parasité pourrait expliquer la différence de vitesse observée.

e)-Relation entre pH externe et vitesse initiale

La chloroquine possédant deux atomes d'azote basique se trouve en solution sous trois espèces chimiques différentes:

- une forme neutre non chargée,
- une forme monoprotée,
- une forme diprotée.

Le graphe de la page ci-contre montre l'évolution de ces trois entités chimiques en fonction du pH de la solution dans laquelle est dissoute la chloroquine. Nous nous sommes donc attachés à déterminer sous quelle forme la chloroquine franchit la membrane.

Le principe de la manipulation est très simple : nous avons mesuré des vitesses initiales à deux pH différents et avons comparé la variation des vitesses initiales expérimentales avec la variation des concentrations théoriques des différentes formes de la chloroquine. Les résultats sont exprimés dans le tableau suivant.

	Hématies saines	Hématies parasitées
Variation expérimentale du pH du milieu d'incubation	7,4 à 7,97	7,37 à 8,01
Augmentation expérimentale de la vitesse initiale de la Chloroquine	X 1,95 \pm 0,7	X 3,3 \pm 0,7
Augmentation théorique de la concentration des formes monoprotées	X 2,55	X 2,85
Augmentation théorique de la concentration des formes neutres	X 9,5	X 12
Augmentation théorique de la concentration des formes diprotées	X 0,69	X 0,65

De l'analyse de ces résultats on peut conclure:

- ce n'est pas la forme diprotonée qui pénètre dans l'hématie saine ou parasitée car la vitesse initiale expérimentale augmente alors que les concentrations en forme diprotonée diminuent .

- la vitesse initiale observée n'est pas due uniquement au passage de la forme neutre (non chargée) car l'augmentation de vitesse initiale expérimentale étant inférieure à l'augmentation théorique de la concentration de cette forme.

- la chloroquine pénètre dans l'hématie saine et parasitée majoritairement sous sa forme monoprotée. En effet, on observe un parallélisme entre l'augmentation de la vitesse initiale et l'augmentation de concentration de cette espèce. Il n'est néanmoins pas exclu que la forme neutre pénètre dans les hématies car la variation en concentration de la forme neutre plus la forme monoprotée n'est pas notablement différente de la variation de la concentration de la forme monoprotée uniquement. Ceci est dû au fait que la quantité absolue de forme neutre disponible est trop faible pour contribuer notablement à la variation totale (neutre et monoprotée).

Discussion

Le but de notre travail était de préciser les relations existantes entre la chloroquine et le parasite au cours du mécanisme de concentration intraparasitaire de cette drogue.

Dans un premier temps, nous avons montré, en utilisant une sonde DAMP, que les souches P.berghei sensible et résistante à la chloroquine possèdent toutes deux des compartiments acides cellulaires qui sont en fait les vacuoles digestives (lieu de dégradation de l'hémoglobine). La détermination du caractère acide des vacuoles digestives pour la souche P.berghei RC (résistante à la chloroquine) a nécessité une approche complémentaire car pour cette souche la sonde DAMP diffuse dans l'ensemble du cytoplasme. Dans ce but, nous avons utilisé la monensine. Cet antibiotique permet la visualisation en microscopie électronique des compartiments acides en évitant des artéfacts éventuels dus à l'emploi d'une base faible pour cibler ces compartiments.

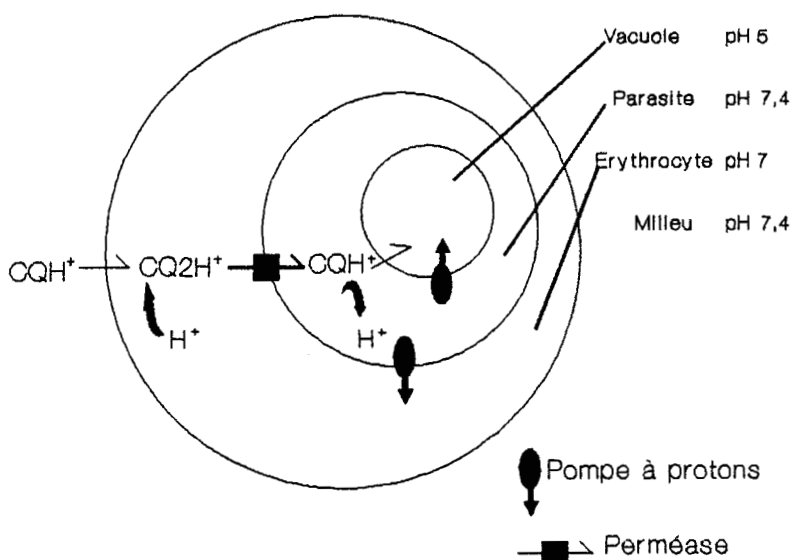
La différence observées entre la souche P.berghei N et la souche P.berghei RC, nous ont conduit à émettre une hypothèse concernant un mécanisme possible de résistance du parasite aux amino-4-quinoléines. La résistance pourrait être liée à l'incapacité de la souche P.berghei RC à maintenir ses vacuoles digestives à un pH acide sous l'action de la chloroquine. Cette incapacité pourrait être liée à un dysfonctionnement des pompes à protons chez la souche résistante et/ou à une inhibition de ces pompes par la chloroquine. Dans les deux cas, le résultat est un déficit de concentration de la chloroquine dans les vacuoles digestives, ces dernières étant le site d'action des amino-4-quinoléines.

L'étude de la chloroquine sans chlore avait pour but de séparer les propriétés de base faible de la chloroquine de ses propriétés antimalariques. Ce travail montre clairement que les propriétés de base faible de la chloroquine sont suffisantes pour permettre le ciblage des vacuoles digestives du parasite par cette drogue, mais sont incapables de rendre compte de sa concentration préférentielle dans le Plasmodium. Le déficit en quantité accumulée de chloroquine sans chlore par rapport à la chloroquine (20 à 50

fois moins) est en totale contradiction avec un mécanisme de concentration lysosomotrope car dans ce type de mécanisme les quantités de chloroquine sans chlore accumulées auraient dû être au moins égales si ce n'est supérieures, étant donné les pKa de la chloroquine sans chlore. Le deuxième point important de ce travail est la démonstration de l'intervention de paramètres structuraux (autres que les deux atomes d'azote basique) dans le mécanisme de concentration intraparasitaire de la chloroquine. En particulier, le rôle prépondérant de l'atome de chlore en position 7.

Nous démontrons l'insuffisance des propriétés de base faible de la chloroquine et l'importance de son atome de chlore dans le processus de concentration intraparasitaire de cette drogue. Au cours du mécanisme d'accumulation intraparasitaire de la chloroquine, il intervient donc une (ou des) interaction (s) qui prend en compte la structure du noyau quinoléique. Quelle est sa nature : Un récepteur ? Un transporteur ?...

Warhurst (48, 58) a émis l'hypothèse de l'intervention d'une perméase dans le mécanisme de concentration intraparasitaire de la chloroquine. La justification de cette perméase repose sur l'analyse des pH des différents compartiments cellulaires du globule rouge parasité (49). Le profil des pH obtenu est représenté dans le schéma suivant.



Profil de pH des divers compartiments d'un érythrocyte parasité et hypothèse

d'un transport actif de la chloroquine par le parasite. La chloroquine (CQ) est majoritairement sous la forme protonée au pH physiologique. La membrane est supposée perméable à la forme monoprotannée CQH^+ mais imperméable à la forme diprotannée $CQ2H^+$. Le passage de la forme $CQ2H^+$ (contre le gradient de proton) est assuré par la perméase fonctionnant grâce à un gradient de pH maintenu par des pompes à protons ($H^+ATPases$)(59).

Le pH [7,4] du cytoplasme parasitaire étant plus alcalin que celui du stroma érythrocytaire [7] interdit la concentration de la chloroquine selon un mécanisme lysosomotrope. La perméase interviendrait donc pour permettre le transport de la chloroquine contre le gradient de protons au travers des membranes de la vacuole parasitophore.

L'analyse des cinétiques de pénétration des bases faibles (antimalariques ou non) entreprise sur P.berghei N se situe dans cette perspective. Peut-t-on espérer caractériser un éventuel récepteur ou transporteur aux amino-4-quinoléines par une analyse des vitesses initiales d'accumulation de ces molécules dans l'hématie parasitée ? Les résultats obtenus montrent principalement que la chloroquine, et elle seule, présente une sélectivité pour l'hématie parasitée. En effet, la vitesse initiale de pénétration de la chloroquine est dix fois plus rapide sur cette cellule. Nous avons donc recherché les causes de cette différence.

Comme la chloroquine existe sous trois formes différentes au pH physiologique (neutre, monoprotannée, diprotannée), on peut imaginer que la forme de pénétration sur l'hématie saine soit différente de celle qui pénètre dans le globule rouge parasité. Or, nous montrons que l'espèce essentiellement impliquée dans le processus d'accumulation est la forme monoprotannée dans les deux types d'hématie. Les résultats de la littérature sont sur ce point contradictoires. En effet, Ferrari et coll. (60) identifient la forme neutre de la chloroquine comme seule responsable de la pénétration de la drogue par diffusion passive de la membrane de l'hématie humaine saine. A l'opposé Ginsburg et coll.(61,62) pensent que la forme neutre seule ne peut rendre compte de la vitesse de pénétration et suggère l'existence d'un transporteur pour la chloroquine chez le globule rouge humain non parasité.

Nous avons envisagé l'hypothèse selon laquelle la chloroquine bénéficierait pour son incorporation de la perméabilité spécifique de l'hématie parasitée. Cette explication est peu probable car la vitesse initiale de pénétration de celle-ci sur l'érythrocyte infesté est insensible à la phlorétine. Cette dernière étant connue pour sa capacité à inhiber cette perméabilité spécifique.

Enfin, nous avons envisagé une autre possibilité où la mesure de la vitesse de pénétration de la chloroquine reflèterait le passage au niveau de la première membrane de la vacuole parasitophore. Cette hypothèse implique que la membrane de l'érythrocyte parasité laisse diffuser très rapidement la chloroquine de telle manière à ce que la concentration dans le cytoplasme érythrocytaire soit égale, très rapidement et en permanence, à la concentration de la chloroquine dans le milieu extérieur. Nous n'avons pour l'instant aucun argument permettant d'étayer cette hypothèse.

L'analyse cinétique permet de mettre en évidence un comportement spécifique de la chloroquine vis à vis du globule rouge parasité. En effet le DAMP (base faible non antimalarique), capable de cibler les vacuoles digestives acides, ne présente aucune différence de vitesse initiale de pénétration entre l'hématie saine et parasitée.

Les résultats concernant l'analyse cinétique ne permettent toutefois pas pour l'instant de déduire de ces éléments l'existence d'un transporteur pour les amino-4-quinoléines chez le Plasmodium.

Conclusion

Comme l'a révélé l'analyse bibliographique, le mode d'action des schizonticides sanguins fait encore l'objet de nombreuses controverses. Le point de départ de notre travail est l'hypothèse d'un mécanisme de concentration lysosomotrope de la chloroquine. La première étape était donc de prouver l'existence de compartiments acides chez le parasite. Nous avons montré que les souches de P.berghei sensible et résistante à la chloroquine possèdent des compartiments cellulaires acides qui sont constitués par les vacuoles digestives du Plasmodium. Cette étude nous a permis de proposer un mécanisme probable de résistance du parasite aux schizonticides sanguins. D'autre part, nous avons essayé de préciser le rôle des propriétés de base faible de la chloroquine dans son mécanisme de concentration intraparasitaire. Nos résultats indiquent clairement que les propriétés basiques de la chloroquine suffisent au ciblage des vacuoles digestives par cette drogue. Mais en aucun cas, elles ne peuvent rendre compte des quantités de molécules accumulées par le Plasmodium. Des caractères structuraux autres que les deux atomes d'azote basique interviennent dans cette accumulation puisque en particulier l'absence de l'atome de chlore réduit le phénomène de concentration. L'analyse cinétique de pénétration des bases faibles avait pour but de caractériser la nature de ces interactions. Les éléments obtenus ne nous permettent pas de conclure à l'existence ou non d'une structure parasitaire nécessaire au mécanisme de concentration des amino-4-quinoléines. La mise en évidence d'une telle structure chez le parasite semble un objectif intéressant pour de futurs travaux.

La compréhension du mécanisme de concentration de la chloroquine s'avère difficile, cependant la poursuite de travaux concernant cet aspect reste prioritaire car il nous apparaît être une étape indispensable à l'étude du mode de résistance. A ce titre, la localisation d'une protéine de type MDR (Multi Drug Resistant) dont le gène a déjà été mis en évidence dans le Plasmodium apparaît primordial. Enfin, des travaux (63) récents font état d'une restitution de la sensibilité à la chloroquine chez des souches

chloroquino-résistantes par l'utilisation d'antidépresseurs inhibiteurs tels que la désipramine. L'analyse des mécanismes physiologiques responsables de la restitution de la sensibilité serait susceptible d'apporter de nouveaux éléments aux mécanismes d'action et de concentration des amino-4-quinoléines.

Matériel et Méthodes

A)-Matériel.

1)-Modèle expérimental : la souris.

Nous travaillons avec des souris femelles swiss de l'élevage JANVIER, âgées de 6 à 12 semaines et pesant en moyenne 25 grammes.

2)-Souches.

Les souches de Plasmodium utilisées sont :

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

a)Evolution des souches.

*)-P.berghei N.

Pour une infestation à raison de 10^8 hématies parasitées par souris, on atteint une parasitémie moyenne de 30 % à 40 % au quatrième jour (J4) après l'inoculation des parasites. A ce stade la réticulocytémie (pourcentage de réticulocytes par rapport au nombre total d'hématies) est normale (< 2 %). Vers J7 J8, la parasitémie devient importante, de l'ordre de 90 %, entraînant la mort de la souris.

La souche P.berghei N se développe donc dans les globules rouges matures (normocytes) et est virulente.

*)-P.berghei RC.

Le développement de cette souche se déroule en deux étapes. On observe très rapidement un maximum de parasitémie en normocytes puis ensuite une montée progressive de la parasitémie en réticulocytes. A partir de J7, la souche évolue uniquement en réticulocytes pour atteindre vers J14 environ 40%, la mort de la souris survenant vers J15 ou J16.

*)-P.Yoelli nigerensis.

Ce Plasmodium possède une croissance extrêmement rapide dans les hématies matures, elle permet par conséquent d'obtenir des parasitémies de 70

% en cinq jours. Cette montée rapide de la parasitémie est mise à profit pour réaliser le test des quatre jours.

b)-Entretien des souches et infestation.

Les souches sont entretenues par passages mécaniques sur des souris saines d'une solution d'hématies parasitées contenant 10^8 hématies parasitées dans 0,5 ml de RPMI.

c)-Cryopréservation.

Les souches sont conservées dans l'azote liquide. On réalise une suspension d'hématies parasitées dans les proportions suivantes :

- 50% de sang de souris parasitée recueilli sur héparine,
- 42% de milieu 199 (milieu nutritif fourni par la firme EUROBIO),
- 8% de D.M.S.O. (Diméthylsulfoxyde).

On répartit par la suite le mélange à raison de 1ml par cryule. La congélation de l'échantillon est réalisée par paliers : 1 nuit à -80°C avant de passer dans l'azote liquide.

Ces souches congelées servent de réserve, en effet il suffit après avoir réchauffé le cryule à 37°C , d'injecter 0,5ml de la solution à une souris saine pour obtenir de nouveau le développement du parasite *in vivo*.

3)-Hématologie.

a)-Frottis sanguin.

Les frottis sanguins sont réalisés à partir d'une goutte de sang prélevée au niveau de la queue, sur une lame dégraissée préalablement au méthanol.

Ils sont séchés rapidement et fixés par du méthanol pendant une minute. La coloration s'effectue dans une solution tamponnée à pH 7,2 de Giemsa 10%. La composition du tampon utilisé est la suivante : KH_2PO_4 (0,7g); NaHPO_4 (1g); qsp 1000ml eau distillée.

b)-Parasitémie.

La parasitémie est le rapport du nombre d'hématies parasitées sur le nombre total d'hématies. On l'exprime généralement en pourcentage.

c)-Détermination du volume globulaire moyen.

Pour la détermination du volume globulaire, nous avons utilisé une méthode basée sur les mesures de volume par de l'inuline radiomarquée. L'inuline obtenue auprès de la firme Amersham est radiomarquée au tritium avec une activité spécifique 1,05 ci/mmole.

L'inuline étant un sucre de haut poids moléculaire, elle est incapable de pénétrer dans les hématies. On mesure donc dans un premier temps la radioactivité (A) contenue dans un ml d'une suspension à 5% d'hématies. Après centrifugation, on mesure la radioactivité (B) d'un ml de surnageant (sans hématie). La différence entre les deux mesures de radioactivité (B-A) nous donne le volume occupé par les globules rouges. Il suffit ensuite de faire une numération pour connaître le nombre d'érythrocytes contenus dans 1 ml pour déterminer le volume globulaire moyen. (B-A) (en unité volumique) divisé par le nombre de globules rouges. Le résultat obtenu par cette méthode (VGM est de $6 \cdot 10^{-14}$ L) a été vérifié à l'aide d'un appareil automatique à numérations sanguines.

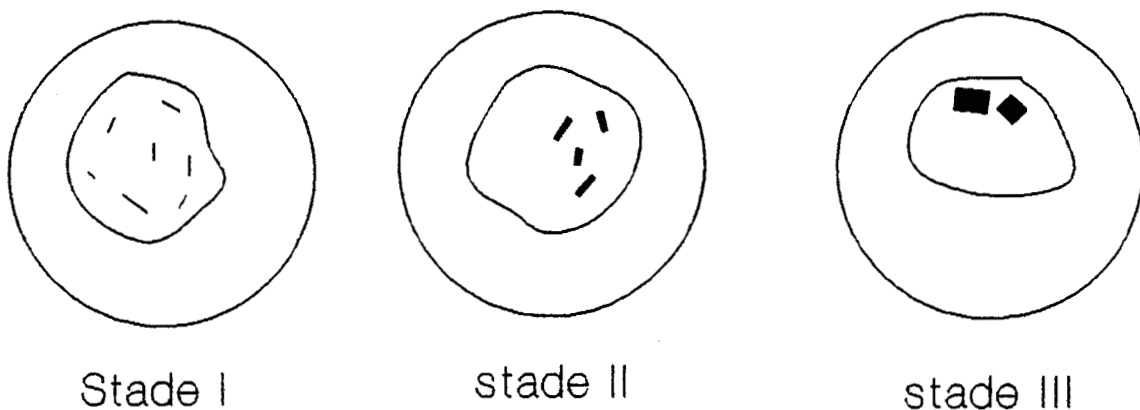
d)-Test des quatre jours.

Des lots de 5 souris infestées par P. yoelii nigeriensis reçoivent dès le jour de leur infestation par injection intrapéritonéale, différentes doses de l'antimalarique étudié (3, 10 et 30 mg/kg) pendant quatre jours consécutifs. Le cinquième jour, on mesure la parasitémie des souris traitées que l'on compare à un lot de souris témoin n'ayant reçu que de l'eau. On détermine grâce à ce test la dose efficace à 90% (DE 90), c'est à dire la dose d'antimalarique donnant une inhibition de 90% par rapport à la parasitémie des souris témoins.

e)-Test de coalescence du pigment malarique.

Une souris parasitée (20-25%) par P.berghei reçoit une dose unique (80 mg/kg) de la molécule étudiée. Des frottis sont effectués à différents temps : 0; 15; 30; 60; 80 minutes.

On observe les frottis fixés, mais non colorés. A l'observation des frottis, on regroupe les parasites en trois classes suivant le degré de coalescence du pigment malarique. Ces trois stades sont représentés par le schéma suivant :



Le pourcentage de stades III exprime l'activité de coalescence de la drogue étudiée. Ce test a été mis au point par Warhurst et al (9).

B)-Microscopie électronique à congélation.

1)-Préparation de l'échantillon.

a)-Fixation.

Le sang est récupéré par prélèvement au niveau de la cavité sous-brachiale à l'aide de pipettes pasteur héparinées. Le sang est fixé 1 heure à 4°C directement dans le mélange de fixateur suivant : 4% formaldéhyde et 1% de glutaraldéhyde en tampon PBS à pH 7,5 (phosphate-buffered saline : 50mM tampon phosphate, 150mM NaCl).

L'échantillon est ensuite lavé en PBS, placé en tube Eppendorf, et centrifugé à 2500 tours/mn pendant 15 minutes.

b)-Imprégnation.

Afin de préserver les structures cellulaires lors de la congélation, on imprègne le culot sanguin par un mélange d'agents cryo-protecteurs dont voici la composition : 25% de glycérol, 5% de diméthylsulfoxyde en tampon PBS. L'imprégnation dure 1 heure au minimum à température ambiante.

c)-Congélation.

Le culot d'hématies est déposé sur des supports à congélation. Ces derniers sont plongés très rapidement dans de l'azote solidifié sous vide (azote pâteux : -200°C). Après congélation, les échantillons sont conservés dans l'azote liquide.

2)-Coupes.

Elles sont réalisées sur un ultracryotome à -100°C (ultracut II de Reichert). Les coupes sont récupérées dans du saccharose 2,3M en PBS et déposées sur des grilles en nickel recouvertes d'une membrane de parlodion et carbonées. Ces grilles sont ensuite déposées sur des gouttes de tampon PBS à 1% d'ovalbumine, afin d'éliminer le sucrose et de saturer grâce à l'ovalbumine les sites d'adsorption non spécifiques.

3)-Immunodétection.

Les grilles sont transférées pendant 1 heure à 37°C sur des gouttes renfermant le polyclonal antiQA dilué au 1/100 en PBS ovalbumine (PBSO). Après un lavage d'une heure en PBSO, on révèle les anticorps, soit par la protéine "A" marquée à l'or (64) diluée au 1/50 dans du PBSO, soit par un sérum de chèvre anti lapin marqué aussi à l'or colloïdal et dilué au 1/100. Viens ensuite une nouvelle série de lavages en PBSO (30 minutes) et PBS (30 minutes), puis les grilles sont rincées abondamment à l'eau distillée. Avant de passer à l'observation au microscope électronique, les coupes doivent nécessairement être contrastées et protégées.

La coloration est en réalité une imprégnation par des sels de métaux lourds (acétate d'uranyle) et la protection par un enrobage de méthylcellulose.

Nous utilisons la méthode de Griffiths et al., 1982 :

-0,2ml d'acétate d'uranyle à 3% H₂O

-1,8ml de méthylcellulose (méthylcellulose à 25 centipoise de chez Fluka AG Buchs Switzerland).

C)-Microscopie électronique classique.

Les échantillons sanguins sont directement fixés au glutaraldéhyde 2,5 % en tampon cacodylate 0,1M à pH 7,4. La fixation dure 1 heure 30 minutes à température ambiante. Après lavage des échantillons par le tampon cacodylate, ces derniers subissent une post-fixation par le tétraoxyde d'osmium à 1% toujours en tampon cacodylate.

L'étape suivante consiste en une déshydratation progressive de l'échantillon par passage dans des bains de plus en plus concentrés en alcool éthylique. Le dernier, d'oxyde de propylène permet l'inclusion de l'échantillon dans l'épon (l'oxyde de propylène étant le solvant de l'épon).

Lorsque l'épon est durci (3 jours à 60°C), les coupes sont effectuées à l'ultramicrotome (Reichert ultracut II), contrastées à l'acétate d'uranyl à 2% en solution alcoolique et par le citrate de plomb selon Reynolds (voir référence).

Nous avons utilisé cette technique de microscopie classique pour visualiser l'effet de la monensine sur P.berghei N et RC.

D)-Synthèses chimiques.

1)-Synthèse de l'analogue de la chloroquine sans chlore.

a)-Monoacétyldiaminobutane.

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

b)-4-phénoxyquinoléine.

*)-Réaction.

On solubilise dans un minimum de phénol (20 ml) et dans un flacon bicol de la 4-chloroquinoléine (5g). On ajoute des pastilles de soude en molarité équivalente à celle de la chloroquinoléine. Le ballon est chauffé à reflux pendant 18 heures à 100°C.

*)-Extraction.

On jette le contenu du flacon sur de la soude 2N. L'extraction est réalisée en ampoule à décanter par du chloroforme.

Le chloroforme contenant la 4-phénoxyquinoléine est évaporé à sec.

c)-(Acétylamino-4-butylamino)-4quinoléine.

A la 4-phénoxyquinoléine dissoute dans un minimum de phénol, on ajoute du monoacétyldiaminobutane (en quantité égale à la moitié du nombre de mole de la 4-phénoxyquinoléine). Le ballon est chauffé à 90°C pendant 18 heures. Le contenu du ballon est jeté sur une solution de soude 2N, on réalise l'extraction par un mélange chloroforme-méthanol dans les proportions 2-1. Après évaporation à sec, le composé est cristallisé dans du méthanol.

d)-(Amino-4-butylamino)-4-quinoléine.

La dernière étape est l'hydrolyse sous reflux par HCl 6N (20ml) de (acétylamino-4-butylamino)4-quinoléine en amino-4-butylamino-4-quinoléine avec libération d'acide acétique.

Après évaporation à sec, la cristallisation dans le méthanol permet d'isoler des cristaux blancs de chlorhydrate (amino-4-butylamino)-4-quinoléine (1g).

2)-Synthèse du DAMP radioactif.

On porte à reflux pendant 24 heures une solution d'acétonitrile (3 ml) contenant à la fois le 1fluoro-2,4-dinitro [3,5-³H benzène] radiomarké, 13 mg (0,07 mmole) du même composé non marqué et la N,N'(propylamino-3) méthylamine (25 mg; 0,179 mmole). Après évaporation du solvant, le résidu huileux est chromatographié sur silice (9 g; 0,06-0,2 mm) par élution de 150 ml d'un mélange méthanol ammoniacal (0%, 2%, 4%, 6%) afin d'éliminer l'excès de diamine.

Le composé final obtenu sous forme de chlorhydrate par traitement à l'acide chlorhydrique est directement mis en solution dans du PBS. L'activité spécifique du DAMP ainsi obtenu est de 41,8 mCi/mmole.

D)-PRODUCTION D'ANTICORPS POLYCLONAUX.

1)-Préparation de l'antigène QA-BSA.

10 mg de BSA (serum albumine de boeuf) et 10 mg de la sonde QA sont dissouts dans 10 ml de tampon phosphate 0,1 M à pH 7. A cette solution, on ajoute 50 ml d'un mélange de formaldéhyde (4 %) et de glutaraldéhyde (1 %). Après une heure et trente minutes de contact, l'ensemble de la solution est dialysé et concentré sous vide à 4°C afin de soustraire l'excès d'aldéhyde. Le concentré est filtré sur une colonne G 25 (PD-10). La concentration en protéine des tubes d'éluat est évaluée par une lecture en spectrophotométrie U.V. à 280 nm, la lecture à 340 nm donnant une estimation de la quantité de sonde QA fixée.

2)-Synthèse du dérivé succinylé de QA.

A 21mg de QA base (1mmole) dissout dans 5 ml de N,Ndiméthylformamide (DMF), on ajoute 110mg d'anhydride succinique (1,1 mM). Le mélange est agité pendant 2 heures à température ambiante. La purification du succinyl QA s'effectue par chromatographie sur colonne de silice (7g; 0,06-0,2 mm) élué par un mélange chloroforme méthanol (20%). Après traitement par HCl, le dérivé chlorhydrate du succinyl QA est cristallisé dans l'éthanol absolu.

3)-Greffage du dérivé succinylé de QA sur la BSA.

On dissout 10 mg de succinyl QA (0,03 mmole) et 5 mg de BSA dans 1 ml d'eau. A cette solution, on ajoute deux fois 5 mg (t=0; t=8 heures) de carbodiimide [chlorhydrate de (1 éthyl-3-diméthylaminopropyl) carbodiimide]. Après 24 heures de contact, la protéine est purifiée 2 fois par tamisage moléculaire sur colonne G25 (PD-10). La fraction protéique est ensuite concentrée par dialyse sous vide à 4°C.

Le dérivé BSA-succinyl-QA est utilisé pour la sensibilisation des microplaques dans le dosage des anticorps de lapin antiQA par la technique E.L.I.S.A. (Enzyme Linked Immunosorbend assay).

4)-Obtention des anticorps polyclonaux.

Des lapins pesants environ 3 kg reçoivent par injection intradermique en 20 ou 30 points d'inoculation une émulsion stable composée de :

- 2 mg d'antigène BSA-QA en solution dans 1 ml de tampon phosphate 0,1 M PH 7.
- 0,5 ml d'adjuvant complet de Freund
- 5 mg de mycobaterium butyricum

Le rappel de vaccination s'effectue un mois plus tard avec la même quantité d'antigène mais où l'on remplace l'adjuvant complet de Freund par de l'incomplet.

On procède ensuite à des prélèvements sanguins régulièrement chaque semaine afin de tester la production d'anticorps par la technique E.L.I.S.A..

5)-Technique E.L.I.S.A..

Des microplaques sont sensibilisées à raison de 25 µg par puits pendant une nuit à +4°C.

-On réalise ensuite trois lavages successifs par un mélange d'eau distillée et de tween 20 à 0,05 % pour éliminer l'excès d'antigène.

-La saturation est réalisée par une solution de PBS à 5% de BSA pendant 1 heure à 37° C.

-Trois nouveaux lavages à l'eau distillée tween 20 à 0,05 %.

-Incubation ensuite à différentes dilutions (1/100; 1/5000; 1/20000) du sérum de lapin contenant les anticorps anti BSA-QSA. La durée de l'incubation est d'une heure à 37° C.

-Trois lavages à l'eau distillée tween 20 à 0,05 % pour éliminer les anticorps non fixés sur l'antigène.

-Incubation d'un sérum de chèvre anti-lapin marqué à la peroxydase pendant une heure à 37° C.

-Quatres Lavages à l'eau distillée tween 20 à 0,5 % pour se débarrasser de l'excès d'anticorps chèvre anti-lapin.

-La révélation de l'antiglobuline de chèvre marquée à la peroxydase se concrétise par l'action d'une solution préparée extemporanément d'orthophénylène diamine (OPD) [4 mg OPD dissout dans 10 ml de tampon citrate (0,02 M) phosphate (0,05 M) à pH 5]. Avant l'emploi, on additionne à cette solution 15 µl de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à 30 %.

-La réaction est arrêtée par 50 µl H_2SO_4 (2N) ajoutés dans chaque puits.

-La lecture est faite en spectrophotométrie à 630 nm.

-Des témoins sont réalisés pour déterminer l'adsorption non spécifique du sérum de lapin sur la BSA.

-Pour les manipulations de compétition effectuées dans le but d'estimer la spécificité du sérum de lapin anti sonde QA, l'incubation du sérum de lapin se déroule avec différentes dilutions de sonde QA pendant 2 heures à 37°C. La suite du protocole est inchangée.

E)-Méthodes d'incubation des parasites.

1)-Milieu pour le maintien de P. berghei N *in vitro*.

Le maintien de *P. berghei* lors des mesures des constantes d'affinité chloroquine-berghei N s'effectue dans du milieu RPMI 1640 additionné d'HEPES 25mM et de 10% de sérum de veau foetal (65). Nous parlerons de RPMI complet par la suite.

2)-Méthode d'incubation pour la mesure des constantes d'affinité.

Le sang est prélevé sur des souris parasitées par P. berghei (J6) par saignée sous-brachiale, filtré sur billes de verre afin d'éliminer les globules blancs et sur poudre de cellulose pour enlever les plaquettes sanguines.

Après trois lavages dans le RPMI, on prépare une solution mère d'hématies à 10% d'hématocrite dans ce même milieu. On prépare simultanément les tubes d'incubation contenant le RPMI et les chloroquines radiomarquée et froide aux différentes concentrations ($5 \cdot 10^{-10}$ M... $5 \cdot 10^{-7}$ M), chaque concentration étant réalisée en triple exemplaires. Les tubes d'incubation et la solution mère sont préincubés à 25°C et maintenus à un pH de 7,4.

Le départ de l'incorporation est donné par l'addition de 0,5ml de la solution mère dans les tubes d'incubation. L'hématocrite final est inférieur à 1%. Après 1 heure d'incubation, l'incorporation de chloroquine est stoppée en jetant le contenu des tubes sur un grand volume de PBS glacé (40 ml). Après centrifugation (7 minutes à 3500 trs/mn), le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est traité pour permettre la lecture de la radioactivité incorporée dans les hématies.

On réalise une incubation très rapide à 4°C afin de déterminer le bruit de fond non spécifique de la radioactivité (adsorption à la surface des cellules et radioactivité contenue dans le volume intercellulaire du culot).

Le culot cellulaire (30µl) est additionné de chloroquine froide (10^{-2} µmoles) pour déplacer la chloroquine adsorbée sur le tube. Il est ensuite lysé par de la soude (0,3 ml; 0,1N) pendant une heure.

Après addition d'isopropanol (0,3 ml)(antimoussant), le lysat érythrocytaire est éclairci par de l'eau oxygénée H_2O_2 30% et ceci pendant une heure.

Après éclaircissement et neutralisation par l'acide chlorhydrique HCl 6N (70µl), les lysats sont enfin mis dans des pilluliers de comptage avec 5ml de liquide scintillant (Readysolve, Beckman). Le spectromètre à scintillation liquide est un Beckman LS 1800.

Pour le calcul de la quantité de chloroquine incorporée par érythrocyte, il ne nous a pas semblé nécessaire de corriger par la parasitémie. En effet, à ces concentrations de chloroquine, la quantité incorporée par les hématies saines est négligeable (47).

3)-Mesure des constantes d'affinité en présence d'inhibiteurs.

Le protocole est pratiquement identique à celui décrit ci-dessus. Néanmoins, la solution mère d'hématies est incubée 15 minutes en présence de l'inhibiteur et l'incorporation de chloroquine est réalisée toujours en présence de l'inhibiteur.

4)- Méthodes de mesure de la vitesse initiale.

a)-DAMP

La méthode est très proche là aussi de celle employée lors de la mesure des constantes d'affinité. Mais cette fois-ci, l'arrêt de l'incorporation est effectué après des temps déterminés (15s, 30s, 1mn,..., 10 mn). Chaque temps d'incubation est réalisé en triple exemplaires. Lors d'une même cinétique, la concentration en DAMP est identique pour chaque temps réalisé.

Ces cinétiques d'incorporation du DAMP ont été réalisées dans le RPMI complet mais aussi dans du PBS 50mM glucosé (2g/l de glucose). Nous n'avons observé aucune différence de vitesse initiale entre ces deux milieux.

b)-Chloroquine

Pour atteindre la vitesse d'incorporation de la chloroquine sur l'hématie saine, nous avons dû mettre au point une autre technique que celle employée précédemment. Après le prélèvement et l'élimination des globules blancs et des plaquettes, nous réalisons une solution mère d'hématies avec un hématocrite voisin de 5% dans du PBS 50mM à 2 g/l de glucose. Cette solution est préincubée à 25°C et maintenue à un pH constant de 7,4. Dans un autre tube, on préincube à 25°C le milieu d'incubation composé de PBS 50 mM à pH 7,4 à 2 g/l de glucose et du mélange chloroquine froide et radiomarquée à la concentration étudiée. La cinétique d'incorporation est réalisée dans des tubes Eppendorf contenant 400 µl de phtalate de butyle. Après avoir déposé 500 µl de milieu d'incubation dans l'Eppendorf, le début de l'incorporation de la chloroquine est donné par l'addition de 500 µl de la solution d'hématies. Lorsque le temps d'incubation choisi est terminé, le tube Eppendorf est centrifugé à 12000 g pendant 5 secondes. Cette centrifugation permet la séparation des hématies du milieu d'incubation contenant la chloroquine. En effet, sous l'action de la force centrifuge, les globules rouges traversent la couche de phtalate de butyle et se culottent au fond du tube Eppendorf.

600 µl du milieu d'incubation sont prélevés et mélangés à 5ml de liquide scintillant pour déterminer la quantité de chloroquine non incorporée par les hématies.

Dans la méthode précédente, nous déterminons directement la chloroquine intracellulaire; cette fois-ci, nous mesurons la disparition de la chloroquine extracellulaire pour en déduire par le calcul la chloroquine incorporée. Nous réalisons toujours un témoin à 4°C pour éliminer la quantité de chloroquine contenue dans le milieu entraînée par les érythrocytes au travers de la couche de phtalate de butyle.

Bibliographie

1. Slomianny C., Prensier G., Charet P.,
Ingestion of erythrocytic stroma by Plasmodium chabaudi
trophozoites : ultrastructural study by serial sectioning and
3-dimensional reconstruction.
Parasitology 90 : 579-588, (1985).

2. 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).

3. Warhurst D.C., Gould S.,
The chemotherapy of rodent malaria XXXIII. The activity of
chloroquine and related blood schizontocides and of some
analogues in drug-induced pigment clumping.
Ann. Trop. Med. Parasitol. 76(3) : 257-64, (1982).

4. Pinder R.M.,
Antimalarials.
Med. Chem. 1 : 492-521, (1970).

5. Macomber P.B., O'Brien R.L., Hahn F.E.,
Chloroquine : physiological basis of drug resistance in P.berghei.
Science 152 : 1374-75, (1966).

6. Fitch C.D.,
Chloroquine resistance in malaria : a deficiency of chloroquine
binding.
Proc. Natl. Acad. Sci. 64 : 1181-87, (1969).

7. Fitch C.D., Yunis N.G., Chevli R., Gonzalez Y.,
High-affinity accumulation of chloroquine by mouse erythrocytes
infected with Plasmodium berghei.
J. Clin. Invest. 54(1): 24-33, (1974).

8. Fitch C.D.,
Chloroquine resistance in malaria : Drug binding and cross
resistance patterns.
Proc. Helmothol. Soc. Wash. 39 : 265-271, (1972).

9. Warhurst D.C., Hockley D.J.,
Mode of action of chloroquine on Plasmodium berghei and
P.cynomogli.
Nature 214 : 935-936, (1967).

10. 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).

11. Fitch C.D.,
Chloroquine resistance in malaria : a deficiency of chloroquine
binding.
Proc. Natl. Acad. Sci. 64 : 1181-87, (1969).

12. Cohen S.N., Yielding K.L.,
Spectrophotometric studies of the interaction of chloroquine with
deoxyribonucleic acid
J. Biol. Chem. 240(7) : 3123-3131, (1975).

13. O'Brien R.L., Hahn F.E.,
Chloroquine structural requirements for binding to
deoxyribonucleic acid and antimalarial activity.
Antimicrob. Ag. Chemother. 315-320, (1975).

14. Schueler F.W., Cantrell W.F.,
Antagonism of the malarial action of chloroquine by the
ferrihemate and an hypothesis for the mechanism of chloroquine
resistance.
J. Pharmacol. Exp. Therap. 143 : 278-281, (1964).

15. Chou A.C., Chevli R., Fitch C.D.,
Ferriprotoporphyrin IX fulfills the criteria for identification
as the chloroquine receptor of malaria parasites.
Biochemistry 19(8) : 1543-9, (1980).

16. Moreau S., Perly B., Biguet J.,
Interaction of chloroquine with ferriprotoporphyrin IX. Nuclear
magnetic resonance study.
Biochimie 64(11-12) : 1015-25, (1982).

17. De Duve C., De Barse T., Poole B., Trouet A., Tulkens P., Van
Hoof F.
Lysosomotropics agents.
Biochem. Pharmacol. 23 : 2495-2531, (1974).

18. Mackenzie, A.H., Scherbel, A.H.,
Chloroquine and hydroxychloroquine in rheumatological.
Therapy. Clin. Rheum. Diseases. 6(3) : 545-566, (1980).

19. De Duve C.,

Lysosomes revisited

Eur. J. Biochem. 137 : 391-397, (1983).

20. Homewood C.A., Warhurst D.C., Peters W., Baggaley V.C.,

Lysosomes, pH and the anti-malarial action of chloroquine.

Nature 235 : 50-52, (1972).

21. Fitch C.D. , Warhurst D.C.,

The mode of action of chloroquine and related malarial schizonticides.

Parasitology today 2 : 329-334, (1986).

22. Roos A., Boron W.F.,

Intracellular pH Physiological Reviews.

61(2) : 296-316, (1981).

23. Yayon A., Cabantchik Z.I., Ginsburg H.,

Identification of the acidic compartment of Plasmodium falciparum-infected human erythrocytes as the target of the antimalarial drug chloroquine.

Embo J. 3(11) : 2695-700, (1984).

24. Krogstad D.J., Schlesinger P.H.,

The basis of antimalarial action : Non-weak base effects of chloroquine on acid vesicle pH.

Am. J. Trop. Med. 36(2) : 213-220, (1987)

25. Ohkuma S., Poole B.,

Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75(7) : 3327-3331, (1978).

26. Aikawa M., Thompson P.E.

Localization of acid phosphatase activity in Plasmodium berghei and Plasmodium gallinaceum : an electron microscopic observation.

J. Parasitol.(3) : 603-610, (1971).

27. Slomianny C.,

Action de la chloroquine sur le processus de dégradation de l'hémoglobine chez Plasmodium sp.

Université des sciences et techniques de Lille Flandres Artois, thèse soutenue en mai 1986.

28. Aissi E., Charet P., Bouquelet S., Biguet J.,

Endoprotease in Plasmodium yoelii nigeriensis.

Comp. Biochem. Physiol. 74B : 559-566, (1983).

29. Levy M.R., Chou S.C.,

Activity and some properties of an acid proteinase from normal and Plasmodium berghei infected red cells.

J. Parasitol. 59(6) : 1064-70, (1973).

30. Ginsburg, H., Nissani, E., Krugliak, M.,

Alkalinization of the food vacuole of malaria parasites by quinoline drugs and alkylamines is not correlated with their antimalarial activity.

Biochem. Pharmacol. 38(16) : 2645-54, (1989).

31. Aikawa, M. High-resolution autoradiography of malarial parasites treated with 3 H-chloroquine.
Am. J. Path. 67(2) : 277-84, (1972).

32. Krogstad D.J., Schlesinger, P.H., Gluzman, I.Y.,
Antimalarials increase vesicle pH in Plasmodium falciparum.
J. Cell. Biol. 101(6) : 2302-9, (1985).

33. Krogstad D.J., Schlesinger P.H.,
The basis of antimalarial action : Non-weak base effects of
chloroquine on acid vesicle pH.
Am. J. Trop. Med. 36(2) : 213-220, (1987).

34. Moreau S., Prensier G., Maalla J., Fortier B,
Identification of distinct accumulation sites of 4-aminoquinoline
in chloroquine sensitive and resistant Plasmodium berghei
strains.
Eur. J. Cell. Biol. 42(2) : 207-210, (1986).

35. Anderson R.G.W., Falck J.R., Goldstein J.L., Brown M.S.,
Visualization of acidic organelles in intact cells by electron
microscopy.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 81 : 4838-42, (1984).

36. Boss W.F., Morre D.J., Mollenhauer H.H.,
Monensin-induced swelling of golgi cisternae mediated by a proton
gradient.
Eur. J. Cell. Biol. 34 : 1-8, (1984).

37. Mahmalgi, J., Veignie, E., Prensier, G., Moreau, S.,
Relations between resistance to chloroquine and acidification of
endocytic vesicle of Plasmodium berghei.

Parasitology 98 : 1-6, (1989).

38. Bass G.E., Hudson D.R., Parker P.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).

39. Irvin J.L., Irvin E.M.,
Spectrophotometric and potentiometric evaluation of apparent acid
dissociation exponents of various 4-aminoquinolines.

J. Amer. Chem. Soc. 69 : 1091-1099, (1947).

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

Université des sciences et techniques de Lille Flandres Artois,
thèse soutenue en novembre 1987.

41. Tabor C.W., Tabor H., Bachrach V.,
Identification of the aminoaldehydes produced by the oxidation of
spermine an spermidine with purified plasma amini oxydase.

The Journal of biological chemistry. 239 : 2194-2203, (1964).

42. Peters W., 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).

43. Feldman M.Y.,
Reaction of nucleic acids and nucleoproteins with formaldehyde
progress in nucleic acid reseach and molecular biology.
Academic Press, New-York 13 : 1-49, (1973).

44. Warhurst D.C., Robinson B.L.
Cytotoxic agents and hemozoïn pigment in malaria parasites
(Plasmodium berghei).
Life Sciences 10 : 755-760, (1971).

45. Vaitukaitis J., Rollins J.B., Niesclag E., Ross T.G.,
A method for producing specific antisera with small doses of
immunogen.
Journal of Clinical Endocrinology 33 : 988-991, (1971).

46. Slomianny C., Charet P., Prensier G.,
Ultrastructural localisation of enzymes involved in the feeding
process in P.chabaudi and Babesia Hylomysci.
J. Protozool. 30 : 376-382, (1983)

47. Diribe C.O., 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(17) : 3019-27, (1985).

48. Fitch C.D., Warhurst D.C.,

The mode of action of chloroquine and related malarial schizonticides.

Parasitology Today 12 : 329-334, (1986).

49. Mikkelsen R.B., Wallach D.F.H., Van Doren E., Nillni E.A.,

Membrane potential of erythrocytic stages of Plasmodium chabaudi free of the host cell membrane.

Mol. Biochem. Parasitol. 21 : 83-92, (1986).

50. Wilson C.M., Serrano A.E., Wasley A., Bogenschutz M.P., Shankar A.H., Wirth D.F.,

Amplification of a gene related to mammalian mdr genes in drug-resistant Plasmodium falciparum.

Science 244(4909) : 1184-6, (1989).

51. Foote S.J., Thompson J.K., Cowman A.F., Kemp D.J.,

Amplification of the multidrug resistance gene in some chloroquine-resistant isolates of Plasmodium Falciparum.

Cell 57 (6) : 921-930, (1989).

52. Foote, S.J., Kyle, D.E., Martin, R.K., Oduola, A.M.J., Forsyth, K., Kemp, D.J., Cowman, A.F.,
Several Alleles of the Multidrug-Resistance Gene Are Closely Linked to Chloroquine Resistance in *Plasmodium-Falciparum*.
Nature 345, (6272) : 255-258, (1990).
53. Wellems, T.E., Panton, L.J., Gluzman, I.Y., Dorosario, V.E., Gwadz, R.W., Walkerjonah, A.;, Krogstad, D.J.,
Chloroquine Resistance Not Linked to Mdr-Like Genes in a *Plasmodium-Falciparum* Cross.
Nature 345, (6272) : 253-255, (1990).
54. Homewood C.A., Warhurst D.C., Baggaley V.C., Atkinson E.M.,
Respiration in intraerythrocytic Plasmodium berghei.
Trans. Royal. Soc. Trop. Med. Hyg. 66(1) : 2-3, (1972).
55. Ginsburg H., Krugliak M., Eidelman O., Cabantchik Z.I.
New permeability pathways induced in membranes of Plasmodium falciparum infected erythrocytes.
Mol. Biochem. Pharmacol. 8 : 177-190, (1983).
56. Ginsburg H., Kuntner S., Zangwil M., Cabantchik Z.I.,
Selectivity properties of pores induced in host erythrocyte membrane by Plasmodium falciparum. Effect of parasite maturation.
Biochim. Biophys. Acta 861 : 196-194, (1986).
57. Polet H., Barr C.F.,
Uptake of chloroquine-3-H3 by Plasmodium knowlesi *in vitro*.
J. Pharmacol. Expt. Ther. 168 : 187-192, (1969).

58. Ginsburg H., Warhurst D.C.,
Calcium antagonist and Chloroquines resistance in malaria.
Parasitology Today 4(8) : 209-213, (1988).
59. Moreau S.,
La chloroquine : Mécanisme d'action antimalarique et résistance.
Médecine/Sciences 5 : 729-735 : (1989)
60. Ferrari V., Cutler D.J.,
Uptake of chloroquine by human erythrocytes.
Biochem. Pharmacol. 39(4) : 753-62, (1990).
61. Yayon A., Ginsburg H.,
A method for the measurement of chloroquine uptake in
erythrocytes.
Analytical Biochemistry 107(2) : 332-6, (1980).
62. Yayon A., Ginsburg H.,
The transport of chloroquine across human erythrocyte membranes
is mediated by a simple symmetric carrier.
Biochim. Biophys. Acta 686(2) : 197-203, (1982).
63. Bitonti A.J., Sjoerdsma A., McCann P.P., et al,
Reversal of chloroquine resistance in malaria parasite Plasmodium
falciparum by desipramine.
Science 242 : 301-303, (1988).

64. Slot J.W., Geuze H.J.,
A new method of preparing gold probes for multi-labeling
cytochemistry.
Eur. J. Cell Biol. 38 : 87-93, (1985).
65. Mons B., Janse C.J., Croon J.J.A.B., Van Der Kay H.J.,
In vitro culture of Plasmodium berghei using a new suspension
system.
Inter. J. Parasitol. 13(2) : 213-217, (1983).
66. Mikkelsen R.B., Tanabe K., Wallach D.F.H.,
Membrane potential of Plasmodium infected erythrocytes.
Journal of Cell Biology 93 : 685-689 (1982).
67. Noguer A., Wernsdorfer W., Kouznetsov R., Hempel J.,
The malarial situation in 1976.
W.H.O. Chron. 32 : 9-17, (1978).
68. Moore D.V., Lanier J.E.,
Observations on two Plasmodium falciparum infections with
abnormal response to chloroquine.
Am. J. Trop. Med. Hyg. : 105-109 (1961).
69. Mc Gregor I. A., Smith D. A.,
Daraprim in treatment of malaria. A study of its effects in
falciparum and quartan infections in west Africa.
Br. Med. J. 1 : 730-734 (1952).

Planches

Planche I

Co-localisation des compartiments acides
par la sonde Damp et la monensine.

P.berghei N.

Vue n°1 : Trophozoïte. Le Damp se concentre uniquement dans les vacuoles pigmentaires (PV).

X 53 000

Vue n°2 : Trophozoïte. Les vacuoles pigmentaires (PV) sont gonflées sous l'action de la monensine.

X 12 000

P.berghei R.C.

Vue n°3 : Trophozoïte. Le Damp se disperse dans l'ensemble du cytoplasme parasitaire (Cy). Le noyau N est exempt de marquage.

X 18 000

Vue n°4 : Trophozoïte. Les vacuoles pigmentaires (PV) sont gonflées sous l'action de la monensine.

X 12 000

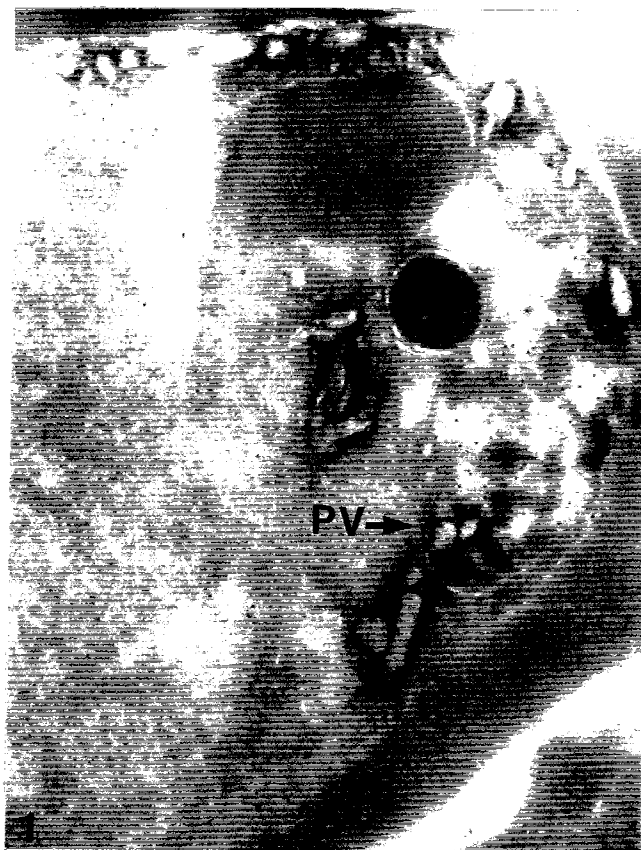


Planche II

Localisation de la sonde QA

P.Berghei N.

Vue n°1 : Trophozoïte. Le marquage est concentré dans les vacuoles pigmentaires (PV).

X 60 000

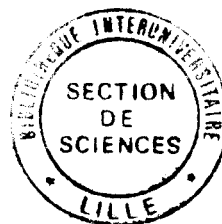
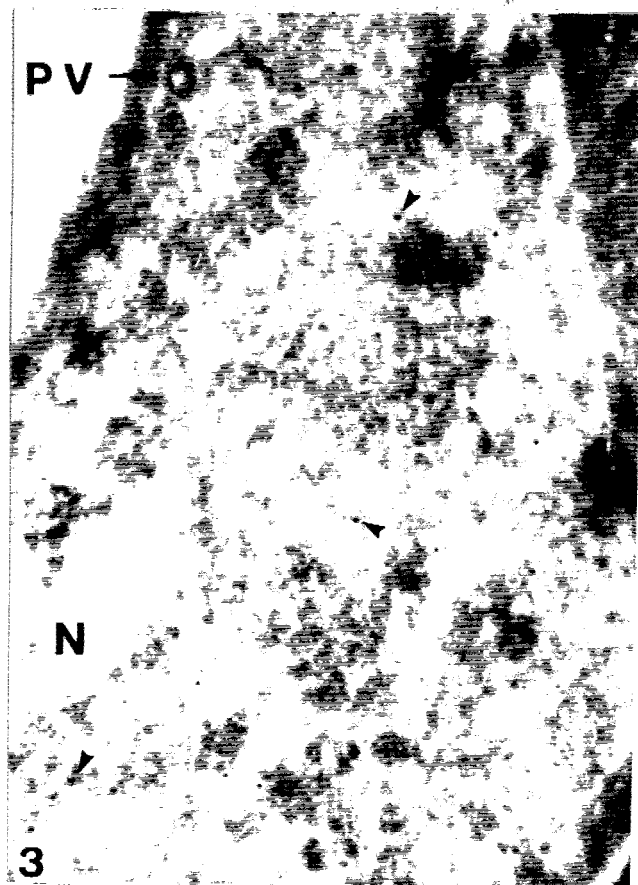
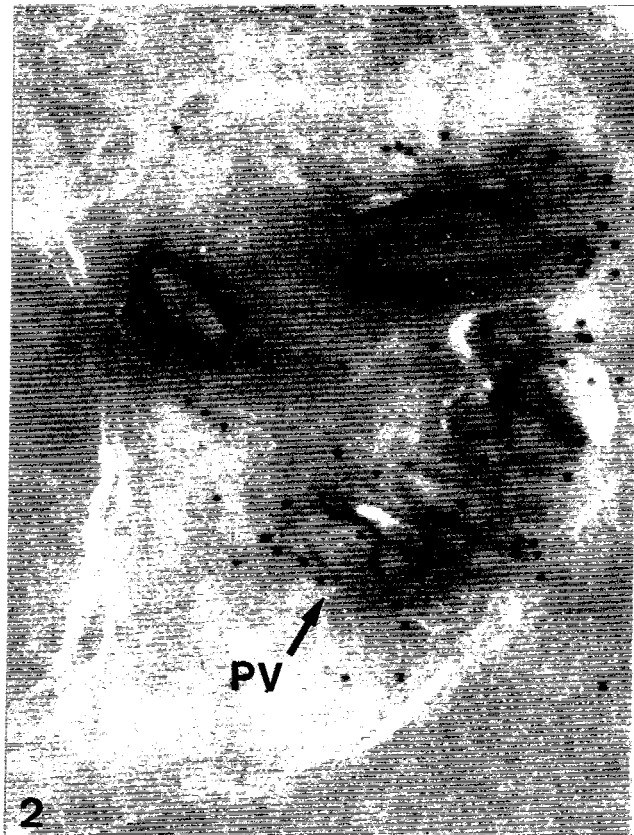
Vue n°2 : Trophozoïte. Vue détaillée des vacuoles pigmentaires (PV) marquées.

X 57 6000

P.berghei R.C.

Vue n°3 : Trophozoïte . Le marquage (petites flèches) est dispersé dans l'ensemble du cytoplasme. La vacuole pigmentaire (PV) n'est pas marquée particulièrement. Le noyau N est exempt de marquage.

X 52 5000



RESUME

Dans cette étude, nous avons tenté de préciser quelques paramètres intervenant dans le mécanisme de concentration intraparasitaire de la chloroquine qu'ils soient d'origine parasitaire ou liés à la structure de la chloroquine.

Nous montrons que les vacuoles digestives des souches P.berghei sensible et résistante à la chloroquine sont acides. D'autre part, nous démontrons que les propriétés basiques de la chloroquine, classiquement impliquées dans le mécanisme de concentration, se sont avérées insuffisantes pour rendre compte des fortes quantités de chloroquine accumulées par le parasite et nous soulignons l'importance de l'atome de chlore en position 7 dans le processus d'accumulation des amino-4-quinoléines. Une analyse cinétique de l'incorporation des bases faibles chez P.berghei N (sensible à la chloroquine) montre une accélération de la vitesse initiale de pénétration de la chloroquine sur des hématies parasitées comparée à la vitesse sur hématies saines. Enfin, nous identifions la chloroquine monoprotinée comme la forme de passage de la membrane érythrocytaire.