

during the period of rapid asexual growth was uniformly lethal to the asexual parasites. However if cAMP was added at a time when the first degenerate parasites appeared in the culture and when also spontaneously some gametocytes appeared in the culture, then it was possible by the addition of this substance to increase the gametocyte production 10 times. This observation needs further confirmation and studies along these lines might add to the clarification of the mechanism of gametocytogenesis. Gametocytogenesis seems to correlate in one way or another with the starvation of the parasites. Gametocytogenesis seems the first step towards an escape of the parasite from an unsuitable environment.

Gametocyte maturation is the final step which is required. By careful maintenance of the cultures we

are able now to achieve exflagellation reproducibly in all isolates producing gametocytes.

We have started with the use of these cultures for the induction of sporozoite production in laboratory reared *A. gambiae* mosquitoes. Although once successfully accomplished, we are not yet able to produce *P. falciparum* sporozoites at will. The days seem nearer now that *P. falciparum* sporozoite and gametes can be used in studies on the expression of sporozoite and gamete specific immune responses under field conditions. This seems relevant for a better understanding of anti-malaria immunity in general and it might be useful for seroepidemiological studies on the intensity of malaria transmission. However our efforts are mainly directed towards contributing to the development of anti-malaria vaccines based on the stages.

Interactions entre *Plasmodium* et les antipaludiques

W. PETERS

London School of Hygiene and Tropical Medicine, Londres (G.B.)

INTRODUCTION

La résurgence actuelle du paludisme dans le monde — et qui est un reflet non seulement de la dégradation de la situation socio-économique mais aussi des problèmes rencontrés par les opérations de lutte contre le paludisme — a rendu nécessaire de nouvelles recherches pour des produits thérapeutiques contre le paludisme. Des souches de *Plasmodium falciparum* résistantes à la chloroquine, au proguanil et à la pyriméthamine font leur apparition dans une étendue géographique toujours grandissante, et leur présence sur le Continent africain est maintenant confirmée. Il est impératif de rechercher des médicaments appartenant à de nouvelles classes chimiques pouvant remplacer les antipaludiques actuellement utilisés au fur et à mesure que ceux-ci perdent de leur efficacité thérapeutique. Le développement de nouveaux médicaments se fait selon deux approches : la première et la plus large de ces approches est le passage au crible, de façon empirique, de substances pharmaceutiques ; la seconde est une approche rationnelle qui demande une connaissance des voies métaboliques de l'orga-

nisme-cible. Jusqu'à présent la plupart des substances antipaludiques ont été découvertes davantage par tâtonnements que par une démarche rationnelle.

LA BIOCHIMIE DE *PLASMODIUM*

Depuis que Laveran (1) (*) a observé pour la première fois l'action de la quinine sur des parasites examinés dans des préparations de sang frais sous lamelle de verre, nous avons compris petit à petit comment certains antipaludiques entravent les processus vitaux des parasites (2). Depuis la Deuxième Guerre mondiale, nous avons beaucoup appris sur la biochimie des stades asexués intraérythrocytaires des parasites du paludisme. Par contre notre connaissance de la biochimie de tous les autres stades de ces organismes obligatoirement intracellulaires reste désespérément pauvre, et ceci est un domaine qui, clairement et de façon urgente, a besoin de recevoir toute notre attention. Nos connaissances actuelles ont été, en grande partie, obtenues à la suite d'essais *in vitro* de culture de plas-

(*) (1 à 26, voir Bibliographie.)

modies à l'intérieur ou à l'extérieur de globules rouges. Ces essais *in vitro* ont été limités dans le temps puisque ce n'est qu'en 1976 qu'un des parasites du paludisme, *P. falciparum*, a pu être cultivé à l'aide d'une tension d'oxygène réduite (3, 4).

Le premier élément indispensable à la croissance de *Plasmodium* est un approvisionnement abondant de glucose. Des investigations faites d'abord avec des parasites aviaires ont indiqué que les parasites tirent leur énergie du glucose par voie anaérobie d'Emden-Meyerhof ainsi qu'à travers le cycle TCA de Krebs (5). Des recherches ultérieures, surtout avec *P. berghei*, ont clairement révélé que, dans des conditions normales, les stades érythrocytaires asexués des parasites des mammifères utilisent sans doute uniquement la voie anaérobie glycolytique. Il n'est donc pas étonnant que la plupart des parasites cultivés ne pouvaient croître que sous un taux d'oxygène réduit ! Trop d'oxygène est de toute évidence préjudiciable à leur croissance, et c'est peut-être dans ce fait que se trouve l'explication de l'action de plusieurs antipaludiques ainsi que l'action d'un certain nombre de traits génétiques qui semblent imposer une limite à la croissance des parasites à l'intérieur des globules rouges (6, 7).

Le caractère obligatoirement intracellulaire des parasites du paludisme est en rapport avec leur dépendance des cellules hôtes pour les processus métaboliques vitaux dont ils sont eux-mêmes dépourvus (5). Étant devenus, pour des raisons évolutives, des habitants de globules rouges, ils voient leurs propres processus vitaux décroître ou même disparaître. Il y a une accumulation grandissante d'observations suggérant qu'en fait les plasmodies intra-érythrocytaires dépendent fortement de certains métabolites fournis par les cellules hôtes. Des observations indiquent que les enzymes nécessaires à diverses voies métaboliques sont « débranchés » lorsqu'ils cessent d'être utiles et sont « ré-embranchés » lorsque les parasites entament la phase invertébrée de leur cycle évolutif.

INSUFFISANCES MÉTABOLIQUES DES PARASITES INTRAÉRYTHROCYTAIRES

Des études effectuées avec *P. lophurae* (8) ont montré que le pantothénate alimentaire, un précurseur du co-enzyme A (CoA), est essentiel à la croissance de ces parasites dans les globules rouges, mais des études ultérieures (9) ont indiqué que chez *P. lophurae* il manque l'enzyme, pantothénate kinase, qui est nécessaire à la conversion du pantothénate en CoA. Par conséquent, *P. lophurae* dépend dans une large mesure

des globules rouges de l'hôte pour synthétiser le CoA et pour le lui fournir préformé. Des essais pour bloquer le métabolisme du pantothénate par des antimétabolites synthétiques du pantothénate ont réussi dans des cultures *in vitro* à court terme de *P. falciparum* et *P. coatneyi*; cependant, parce que de tels antimétabolites synthétiques n'ont sans doute pas une action sélective contre les parasites, ils n'ont pu être utilisés *in vivo*. Depuis, plusieurs autres points où le parasite est dépendant des enzymes ou des produits métaboliques de l'hôte ont été décrits.

Un autre cofacteur présentant un point vulnérable dans le métabolisme des stades asexués de *P. falciparum* semble être la pyridoxine qui est convertie en un phosphate dans les globules rouges; ceci est en effet un cofacteur essentiel dans beaucoup de réactions enzymatiques telle que la transamination. Des observations récentes viennent soutenir l'hypothèse selon laquelle le taux peu élevé de pyridoxine kinase dans les globules rouges des Africains offre un avantage sélectif dans une région où le paludisme à *P. falciparum* est holo-endémique (10). Il n'a pas encore été déterminé si les parasites doivent dépendre de la pyridoxine kinase de la cellule hôte ou s'ils la synthétisent eux-mêmes. De toute façon il est difficile, dans ce cas également, d'imaginer la production d'un antimétabolite capable de bloquer de manière sélective le métabolisme du parasite, c'est-à-dire sans bloquer en même temps celui de l'hôte.

Un troisième exemple d'insuffisance chez les stades asexués érythrocytaires est l'enzyme clé du shunt pentose-phosphate, le glucose-6-phosphate-déshydrogénase (G-6-PD). Il y a à présent d'abondantes indications suggérant qu'au moins *P. berghei* et *P. knowlesi*, les deux espèces étudiées, sont déficientes en G-6-PD et dépendent soit de l'enzyme de l'hôte soit des produits métaboliques de cet enzyme de l'hôte, pour la synthèse des sucres riboses essentiels à la synthèse de l'acide nucléique. Les gènes gouvernant la synthèse du G-6-PD existent, tout au moins chez *P. berghei*, et deviennent « déreprimés » lorsque le parasite entre dans les stades sporogoniques de son évolution. Dès le début de la phase érythrocytaire, les gènes sont à nouveau « réprimés » et le parasite a de nouveau recours à l'enzyme ou aux produits enzymatiques de l'hôte. Bien que l'activité du G-6-PD ait été démontré chez le schizonte pré-érythrocytaire, on ne sait si, à ce stade, l'enzyme a son origine chez le parasite ou chez l'hôte (11). Vu l'activité intense de synthèse de l'acide nucléique chez le schizonte du foie, il paraît évident que l'activité du G-6-PD doit être également intense et par conséquent il est probable que le parasite produise l'enzyme lui-même. Il est intéressant de rappeler que les globules rouges de personnes

ayant une insuffisance héréditaire de G-6-PD sont particulièrement susceptibles aux oxydants et contiennent moins de glutathion réduit dont une des fonctions est de protéger les globules rouges contre les méfaits de l'oxydant (7). On a longtemps admis le fait qu'une insuffisance en G-6-PD confère un avantage sélectif dans les régions où le paludisme à *P. falciparum* est holoendémique, bien que cette hypothèse n'ait toujours pas été universellement acceptée. Des médicaments, telle la primaquine, qui agissent sur le délicat potentiel d'oxydation-réduction dans l'érythrocyte, ainsi que le tout premier antipaludique synthétique le bleu de méthylène (12) exercent sans doute leur action antipaludique en gênant non pas la voie glycolytique mais la voie vitale du pentose-phosphate de la cellule hôte et aussi du parasite. En effet, la primaquine elle-même a une marge de toxicité sélective tout juste suffisante pour permettre son utilisation chez l'homme, et même à des doses thérapeutiques elle produit une certaine hémolyse des globules rouges non infectés et aussi de ceux infectés, par son influence sur le métabolisme du glutathion. Certains types d'insuffisances en G-6-PD affectent également les tissus et une insuffisance du foie en G-6-PD peut profondément affecter les relations hôte-médicament, hôte-parasite et hôte-médicament-parasite (7). Le mode d'action exact de la primaquine contre les parasites du paludisme n'est pas connu, et en effet il n'est toujours pas certain si l'action hémolytique de ce médicament a un rapport quelconque avec son action sur le métabolisme du parasite. Ce n'est certainement pas par ce moyen que la primaquine inhibe la croissance de schizontes exoérythrocytaires et, tout au moins chez ceux de *P. fallax*, des observations prouveraient que le médicament influe sur la respiration mitochondriale.

VOIES MÉTABOLIQUES CONDUISANT ELLES-MÊMES À L'ACTION SÉLECTIVE DES MÉDICAMENTS

D'après ce qui précède il y a de toute évidence peu d'intérêt à produire des antipaludiques dirigés initialement contre les enzymes ou les voies par lesquels le parasite dépend de son hôte. Manifestement, il est préférable de déterminer (a) les étapes métaboliques qui sont essentielles pour le parasite mais non pour l'hôte ou (b) les enzymes présents à la fois chez le parasite et chez l'hôte mais ayant des caractéristiques physico-chimiques différentes.

(a) Étapes métaboliques nécessaires au parasite mais non à l'hôte

Un exemple classique de ce cas est l'incapacité des stades asexués intra-érythrocytaires de *Plasmodium* d'utiliser le folate préformé dans les premières phases du métabolisme des purines (14). De nombreuses bactéries aussi bien que les parasites du paludisme conjuguent l'acide para-aminobenzoïque (PABA) au pyrophosphate de ptéridine (dérivé du GTP, guanosine-triphosphate). Les sulfamides et sulfones déplacent l'acide *p*-aminobenzoïque pour former un taux d'hydroptéroate qui ne peut être utilisé dans les étapes suivantes : la conjugaison avec le glutamate pour former le dihydrofolate et la conversion (par la dihydrofolate réductase) du dihydro- en tétrahydrofolate. Les cellules des vertébrés sont capables d'utiliser le folate préformé de leur alimentation pour produire du dihydrofolate et, par conséquent, manquent de dihydroptéroate synthétase et sont insensibles à l'action inhibitrice des sulfamides et des sulfones. Pour d'autres raisons les sulfones provoquent aussi l'hémolyse des globules rouges chez les individus déficients en G-6-PD, et tandis que l'action antipaludique du dapson est contrariée par le PABA, l'action hémolytique ne l'est pas (15).

Une autre différence concernant le métabolisme des purines chez le *Plasmodium* et dans les tissus de l'hôte réside dans la dépendance du parasite vis-à-vis de l'hypoxanthine préformée. Cette dernière est synthétisée en dehors de la membrane du parasite et est transportée à l'intérieur du parasite avant la conversion en inosine monophosphate (16). Étant donné que l'utilisation de l'inosine monophosphate est rapide, l'approvisionnement en hypoxanthine pourrait être un nouveau point d'attaque chimiothérapeutique particulièrement sensible (17). La cordycépine, un analogue synthétique de l'adénosine (qui est facilement convertie en hypoxanthine) s'est révélée posséder une action antiparasitaire marquée, mais être toxique pour l'hôte (18).

Il a été montré récemment que les parasites du paludisme (e.g. *P. lophurae*) synthétisent aussi certaines pyrimidines *de novo*, en convertissant l'acide orotique en uridine-monophosphate avec l'aide de deux enzymes, l'orotate phosphoribosyl transférase et l'orotidylate décarboxylase (19). Les globules rouges infectés par *P. berghei* et *P. vinckei* contiennent aussi de la dihydroorotate déshydrogénase, tandis que les hématies non infectées, adultes, n'en contiennent pas (20). Chez les mammifères et chez le *Plasmodium* cet enzyme est mitochondrial et est intimement associé à la chaîne respiratoire cytochrome (16). La relation

de l'ubiquinone avec cette chaîne sera évoquée plus loin. Plusieurs analogues synthétiques de la pyrimidine, particulièrement le 5-azaorotate, inhibent deux des enzymes extraits de *P. berghei* lors de tests *in vitro* (21). Tandis que de tels antimétabolites sont toxiques aussi pour les tissus des mammifères et sont, en fait, utilisés comme agents antinéoplasiques, les effets adverses sur l'hôte pourraient être enrayés par l'administration d'uridine que les cellules de l'hôte peuvent utiliser directement, ce que ne peut faire le parasite. Un point ne semble pas encore avoir été clarifié, c'est de savoir si les grandes quantités de ces enzymes qui apparaissent dans les globules rouges parasités proviennent du parasite ou de l'hôte, bien que des résultats préliminaires suggèrent qu'au moins la dihydroorotate déshydrogénase de *P. berghei* diffère de celle des tissus de l'hôte et des réticulocytes (22).

(b) Différents isoenzymes ou cofacteurs du parasite et de l'hôte

Les dihydrofolate réductases des mammifères et des plasmodies diffèrent de façon marquée à la fois dans leur poids moléculaire et leurs points de liaison caractéristiques avec les médicaments inhibiteurs (14). Ceci a constitué la base de la recherche pour la toxicité hautement sélective de nombreux composés antibactériens et antiparasitaires qui bloquent l'activité de ces enzymes chez les parasites. La pyriméthamine et la triméthoprime, par exemple ont des affinités bien plus grandes pour les dihydrofolate réductases de *Plasmodium* et de bactéries, respectivement, que, disons, pour l'enzyme du foie de souris. Le rôle de la chaîne cytochrome dans les stades érythrocytaires du métabolisme plasmodien n'a pas été clairement déterminé bien qu'il semble que les enzymes mitochondriaux du cycle TCA soient actifs dans les stades sporogoniques (11). Un rôle éventuel de l'ubiquinone en relation avec le métabolisme de la pyrimidine a été mentionné précédemment. Les plasmodies des mammifères contiennent de l'ubiquinone 8, tandis que l'ubiquinone 10 est utilisée par les tissus de l'hôte (23). Il a été avancé que c'est peut-être là le point où certains naphthoquinones, tels la ménoctone, et peut-être les produits métaboliques de ces naphthoquinones exercent leur action antiparasitaire sélective (24).

CONCLUSIONS

Des deux approches pour le développement des médicaments antipaludiques, l'une rationnelle et l'autre empirique, laquelle semble la plus rentable

pour une dépense d'efforts donnée ? Au cours des dernières années l'approche empirique n'a fourni, parmi plus de 235 000 composés passés au crible, qu'une poignée de nouveaux composés pouvant faire l'objet d'essais cliniques, et encore parmi ces quelques composés sélectionnés il y a des analogues très proches (25). Si nous choisissons la voie rationnelle, les buts à atteindre ne sont pas, par exemple, les défauts biochimiques des parasites qui peuvent être compensés par l'utilisation des métabolites ou des enzymes de l'hôte, mais bien plutôt les stades métaboliques essentiels pour le parasite et non pour l'hôte, ou les stades où entrent en jeu des enzymes catalyseurs significativement différents chez le parasite et l'hôte. Les composés qui agissent de l'une ou l'autre de ces deux manières n'ont pas été délibérément désignés dans ce but, mais c'est rétrospectivement qu'on a découvert qu'ils agissaient ainsi. Quoi qu'il en soit, il y a peu de doute qu'à l'avenir une connaissance comparative, approfondie de la biochimie du parasite et de l'hôte mettra en lumière plusieurs points de différence qui offriront des cibles spécifiques pour la mise au point de médicaments ou pour le criblage *in vitro* de composés agissant, par exemple, contre des enzymes sélectionnés. Entretemps, toutes les voies vers le développement de nouveaux antipaludiques devraient être suivies, sans oublier les investigations de la médecine traditionnelle, approche qui a récemment révélé les propriétés potentielles antipaludiques et la structure chimique originale d'un remède chinois vieux de 2 000 ans, le Qinghaosu, dont le principe actif est un lactone sesquiterménique, connu maintenant sous le nom d'artémésinine (26).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. LAVERAN (A.), 1892. — Du Paludisme, Gauthiers-Villars et fils, Paris.
2. SHERMAN (I. W.), 1979. — *Microbiological Rev.*, 43, IV, 453.
3. TRAGER (W.) and JENSEN (J. B.), 1976. — *Science*, 193 : 673-675.
4. HAYNES (D.), DIGGS (C. L.), HINES (F. A.) and DESJARDINS (R. E.), 1976. — *Nature*, London, 263 : 767-769.
5. ROEHLER (J. W.), 1962. — *The Biochemistry of Intracellular Parasitism*, University of Chicago Press, Chicago.
6. MOTULSKY (A. G.), 1964. — *Am. J. trop. Med. Hyg.*, 13 : 147-158.
7. POWELL (R. D.), BREWER (G. J.), DEGOWIN (R. L.) and CARSON (P. E.), 1966. — *Mil. Med.*, 131 (Supp.) : 1039-1056.
8. TRAGER (W.), 1977. — *Bull. WHO*, 55 : 285-289.
9. BENNETT (T. P.) and TRAGER (W.), 1967. — *J. Protozool.*, 14 : 214-216.

10. SMITH (S. K.), MILLER (L. H.), KARK (J. A.), HICKS (C. U.), HAUT (M. J.), OKOYE (V. C.) and ESAN (G. J. F.), 1978. — *Lancet*, 1 : 466-468.
11. HOMEWOOD (C. A.), 1978. — *Biochemistry. In* : Rodent Malaria (Killick-Kendrick, R. and Peters, W., Eds.). Academic Press, London : 169-211.
12. GUTTMAN (P.) and EHRLICH (P.), 1891. — *Berliner klin. Wchschr.*, 39 : 953-956.
13. AIKAWA (M.) and BEAUDOIN (R. L.), 1969. — *Mil. Med.*, 134 (Supp.) : 986-999.
14. FERONE (R.), 1977. — *Bull. WHO*, 55, 291-298.
15. McNAMARA (J. V.), EPPES (R. B.), POWELL (R. D.) and CARSON (P. E.), 1966. — *Mil. Med.*, 131 (Supp.) : 1057-1060.
16. GUTTERIDGE (W. E.) and COOMBS (G. H.), 1977. — *Biochemistry of parasitic protozoa*. Macmillan, London.
17. Van DYKE (K.), TRUSH (M. A.), WILSON (M. E.) and STEALEY (P. K.), 1977. — *Bull. WHO*, 55 : 253-264.
18. TRIGG (P. I.), GUTTERIDGE (W. E.) and WILLIAMSON (J.), 1971. — *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 65 : 514-520.
19. WALSH (C. J.) and SHERMAN (I. W.), 1968. — *J. Protozool.*, 15 : 763-770.
20. KROOTH (R. S.), WUU (K. D.) and MA (R.), 1969. — *Science*, 164 : 1073-1075.
21. O'SULLIVAN (W. J.) and KETLEY (K.), 1980. — *Ann. trop. Med. Parasit.*, 74 : 110-114.
22. BENNETT (J.), GERO (A.) and O'SULLIVAN (W. J.), 1979. — Pyrimidine metabolism in rodent malaria. Abstract of paper presented at Meeting of the Australian Society for Medical Research, December 1979.
23. SKELTON (F. S.), RIETA (P. J.) and FOLKERS (K.), 1970. — *J. Med. Chem.*, 13 : 602-606.
24. PETERS (W.), 1974. — *Nature*, London, 249 : 305-306.
25. ROZMAN (R. S.) and CANFIELD (C. J.), 1979. — *Adv. Pharmacol. Chemother.*, 16 : 1-43.
26. Qinghaosu Antimalaria Co-ordinating Research Group, 1979. — *Chinese Med. J.*, 92 : 811-816.

Consommation en acides aminés de *Plasmodium falciparum* in vitro

L. MONJOUR*
B. BOUSQUET**
D. LAMBERT*
D. FERRAND**
P. DRUILHE*
M. GENTILINI*

* Laboratoire de Parasitologie, Pitié Salpêtrière, 83 boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris

** Laboratoire de Biochimie, Hôpital Saint-Louis, 22 place du Docteur-Fournier, 75475 Paris Cedex 10

Un chapitre important de la littérature biomédicale traite des variations de certains paramètres du profil protéique au cours des infections parasitaires. Les recherches menées au sein de populations animales et humaines ont montré que l'infection paludéenne provoquait des déficits importants du bilan azoté et une diminution marquée du taux de l'albumine sérique.

On s'est moins intéressé au métabolisme des acides aminés au cours du cycle évolutif de *Plasmodium falciparum* in vivo ; en raison, sans doute du danger que représente l'observation prolongée d'un parasite, mortel sans traitement.

Un milieu de culture de composition bien connue (milieu de Trager et Jensen) et favorable à la croissance de *P. falciparum* (souche FCR₃), peut aider à déterminer ses besoins nutritionnels. La consommation en acides aminés (acide aspartique, thréonine, sérine, acide glutamique, proline, glycine, alanine, glutamine, valine, cystine, méthionine, isoleucine, leu-

cine, tyrosine, tryptophane, phénylalanine, ornithine, lysine, histidine, arginine).

Au cours de cette étude, nous avons montré que 30 jours de stockage du milieu de culture au réfrigérateur (+ 4° C) entraîne une diminution de la teneur en acides aminés, maximum pour l'acide glutamique et aspartique, moins élevée pour la cystine, la sérine, l'isoleucine, la leucine, la thréonine et la valine.

L'Iniprol qui est un inhibiteur spécifique des protéases ne favorise pas la conservation à long terme (1 mois à + 4° C) des acides aminés en particulier de la glutamine, de la proline, du tryptophane, de la thréonine.

En fait, les milieux frais, préparés juste avant la culture, contiennent généralement les plus fortes concentrations en acides aminés.

La consommation de *P. falciparum* a été déterminée en comparant deux milieux de culture identiques, de mêmes volumes (1,5 ml) et contenant l'un,