

Détection de molécules potentiellement antipaludiques

Avec l'apparition et le développement de résistances aux antipaludiques d'utilisation courante, il est important de trouver de nouveaux composés actifs contre *Plasmodium*, l'agent du paludisme. Pour mettre en évidence l'activité antipaludique d'un composé, il faut mesurer sa capacité à inhiber le développement du parasite entier - à divers niveaux de son cycle biologique et en particulier sa phase érythrocytaire - et à bloquer le fonctionnement du parasite.

La mesure de l'impact d'une molécule sur le parasite entier n'est pas adaptée au criblage de grandes séries d'échantillons alors que la méthode des cibles permet d'envisager l'évaluation de milliers de composés et donc d'augmenter théoriquement les chances de trouver un nouvel agent antipaludique.

Dans ce but, nous avons mis au point une cible pharmacologique issue du parasite responsable du paludisme et adaptée au criblage à haut rendement de l'industrie pharmaceutique.

La cible

Au cours de son cycle dans l'hématie, le parasite dégrade l'hémoglobine de la cellule hôte, à l'intérieur de sa vacuole alimentaire. L'hémoglobine indispensable à la respiration cellulaire est composée d'une partie protéique (la globine) et d'une structure moléculaire complexe centrée sur un atome de fer (l'hème) qui porte l'oxygène et le gaz carbonique de la respiration. Les acides aminés de la globine sont utilisés pour la fabrication des protéines du parasite. Les groupements héminiques sont potentiellement toxiques pour le parasite puisqu'ils sont fortement oxydants. Ils doivent donc être éliminés par le parasite. Ces molécules sont séquestrées par le parasite par un phénomène de polymérisation au cours duquel les groupements héminiques sont couplés deux par deux, perdant ainsi leur potentiel toxique, puis éliminées de la vacuole alimentaire. Ce dimère est appelé hémozoïne ou pigment malarique.

Une drogue capable de bloquer cette polymérisation est donc potentiellement toxique pour le parasite. C'est le mécanisme d'action de certaines molécules utilisées en thérapeutique comme la chloroquine. En effet, cette dernière qui se concentre dans la vacuole alimentaire a montré son aptitude à bloquer la formation de l'hémozoïne. Il en va de même, à des degrés divers, pour d'autres antipaludiques.

La formation de l'hémozoïne est un phénomène unique, spécifique *du parasite*, elle représente donc une cible de choix, mais son mécanisme est encore discuté. En effet, si un consensus existe sur le fait qu'elle n'ait lieu qu'à un pH compris entre 5.2-5.4, c'est-à-dire celui de la vacuole parasitaire, en revanche la formation de l'hémozoïne elle-même est sujette à controverses. Selon certains auteurs, ce phénomène ferait intervenir des enzymes. Mais cette hypothèse n'explique pas le fait que la polymérisation supporte des températures élevées non compatibles avec le fonctionnement des enzymes et l'action de protéases qui détruisent les enzymes et n'empêche pas la formation de l'hémozoïne. Il a été toutefois démontré que des protéines particulières déclenchaient la polymérisation. Enfin de l'hémine, dans des conditions acides, se polymérise spontanément sans apports extérieurs dans un simple tube à essai.

Ces observations ont conduit à la mise au point de différentes techniques de fabrication d'hémozoïne de synthèse. Elles font toutes appel à l'utilisation d'hémine en milieu plus ou moins acide, incubée avec ou sans résidus parasitaires, pendant 18 à 24 heures à 37°C.

La détection de l'hémozoïne formée se fait par spectrophotométrie ou radiomarquage.

Une centaine de composés actifs sélectionnés

Nous avons mis au point une technique simple de synthèse de l'hémozoïne *in vitro* adaptable au criblage à haut rendement, simple à mettre en œuvre, économique, sans utilisation de composants en provenance du parasite, en milieu non stérile et utilisable pour mesurer le potentiel pharmacologique de molécules de synthèse ou naturelle de toutes origines

Cette méthode a été adaptée au criblage à haut rendement et a permis le criblage de 30 000 produits sur le robot de nos partenaires du CNRS et de Pierre Fabre médicament. Une centaine de composés actifs ont ainsi pu être sélectionnés pour leur activité sur cette étape clé du développement de *Plasmodium*.

Par Eric Deharo et Stéphane Bertani

deharo@cayenne.ird.fr

stephanebertani@hotmail.com

Pour en savoir plus

Rasoanaivo, Ph., Deharo, E., Ratsimamanga-Urverg, S., Frappier, F. (2004) Guidelines for the evaluation of the non-clinical efficacy of traditional antimalarials in “ Traditional Medicine, Medicinal Plants and Malaria ” . London: CRC press. 431 pages

Deharo, E., Garcia, R., Oporto, P., Sauvain, M., Gautret, Ph., Ginsburg H. (2002) A non-radiolabeled ferriprotoporphyrin IX biomineralization inhibition test (FBIT) for the high throughput screening of antimalarial compounds. *Experimental Parasitology*. Volume 100, Number 4, pp. 252-256.

Baelmans, R., Deharo, E., Bourdy, G., Munoz, V., Quenevo, C., Ginsburg, H. (2000) A Search for Natural Bioactive Compounds in Bolivia through a Multidisciplinary Approach. Part IV. Is a new haem polymerisation inhibition test pertinent for the detection of antimalarial natural products? *Journal of Ethnopharmacology*. 73, 271-275.

Baelmans, R., Deharo, E., Munoz, V., Sauvain, M., Ginsburg, H. (2000) Experimental conditions for testing the inhibitory activity of chloroquine on the formation of β -haematin. *Experimental Parasitology*. 96 243-248.

Sites WEB d'intérêt

<http://jhmalaria.jhsph.edu/hemozoin/>

<http://www.rph.wa.gov.au/labs/haem/malaria/index.html>