

► En 1996, la découverte qu'un organeite limité par plusieurs membranes à l'intérieur des cellules de *Plasmodium* et de *Toxoplasma* était un vestige de chloroplaste a bouleversé notre vision de ces parasites dans « l'arbre de la vie » et ouvert un champ d'investigation nouveau pour la recherche de traitements antiparasitaires, en particulier antipaludiques. Cette revue résume notre compréhension de l'évolution sophistiquée des parasites du groupe des Apicomplexes, et couvre sommairement une décennie de recherche et de développement de candidats médicaments visant à cibler le parasite au niveau de son organeite végétal. Il semble, 15 ans après la découverte de l'apicoplaste et 10 ans après la publication du génome complet de *Plasmodium falciparum*, que nous soyons arrivés au bout d'une première phase de tests des antibiotiques et des herbicides disponibles. La phase hépatique constitue le seul stade du développement parasitaire pour lequel certaines fonctions de l'apicoplaste, telles que la biosynthèse des acides gras, semblent indispensables. Concernant la phase érythrocytaire, les résultats récents orientent les recherches sur les processus contrôlant la biogenèse de l'apicoplaste et sur une fonction biologique particulière portée par cet organeite, la biosynthèse des isoprénoïdes, comme cibles prometteuses pour de futurs traitements. ◀

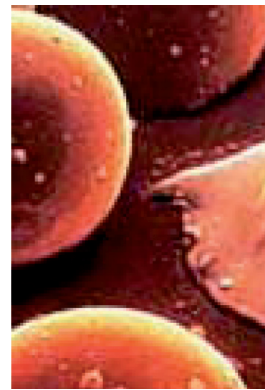
État de la pandémie : progrès des mesures prophylactiques, fragilité des traitements thérapeutiques existants

Le paludisme est une parasitose aiguë ou chronique due à des eucaryotes unicellulaires du genre *Plasmodium*, transmis par la piqûre de moustiques femelles Anophèles (Figure 1). Cinq espèces de *Plasmodium* sont pathogènes pour l'espèce humaine (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. mala-*

Paludisme

Recherche de nouvelles approches thérapeutiques ciblant l'apicoplaste, un organeite cellulaire d'origine algale

Christophe Biot¹, Cyrille Y. Botté^{2,3},
Faustine Dubar⁴, Éric Maréchal²



riae, *P. ovale* et *P. knowlesi*). L'infection par *P. falciparum* est la forme la plus fréquemment mortelle.

Près de la moitié de la population mondiale vit dans des régions infestées, essentiellement en zones tropicales. Le continent africain est le plus touché avec 90 % des cas cliniques répertoriés. En 2010, l'OMS (organisation mondiale de la santé) fait état d'évolutions récentes rapides, certaines encourageantes, d'autres inquiétantes [1]. Grâce aux programmes mis en œuvre de 2008 à 2010, des moustiquaires imprégnées d'insecticides ont été mises à disposition de 500 millions de personnes et des insecticides sous forme d'aérosols ont permis le traitement des habitations de 75 millions de personnes. Au cours de la dernière décennie, une majorité des pays en zone endémique rapporte une réduction de plus de 50 % des cas de paludisme et de la mortalité qui y est associée. L'éradication est même certifiée dans certains pays comme le Maroc. Ces résultats sont encourageants, mais pour que ce succès soit pérenne, les mesures sanitaires engagées doivent être poursuivies et consolidées. Dans les années 1940, l'efficacité de la chloroquine et l'introduction des insecticides organochlorés laissaient présager qu'il serait un jour possible de contrôler le paludisme. Si ce fléau a en effet été éradiqué des zones tempérées par des actions préventives combinées à l'usage de médicaments antipaludiques efficaces à l'époque, quinine et chloroquine

¹ Université Lille Nord de France, université Lille 1, unité de glycobiologie structurale et fonctionnelle, 59650 Villeneuve d'Ascq Cedex, France ; CNRS, UMR 8576, F-59650 Villeneuve d'Ascq Cedex, France ;

² Laboratoire de physiologie cellulaire végétale, UMR 5168, CNRS-CEA-INRA-université Joseph Fourier Grenoble 1, 38054 Grenoble Cedex, France ;

³ Plant Cell Biology Research Centre, School of Botany, University of Melbourne, Victoria 3010, Australie ;

⁴ Université Lille Nord de France, université Lille 1, unité de catalyse et chimie du solide, 59650 Villeneuve d'Ascq Cedex, France ; CNRS, UMR 8181, F-59650 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.

christophe.biot@univ-lille1.fr

eric.marechal@cea.fr

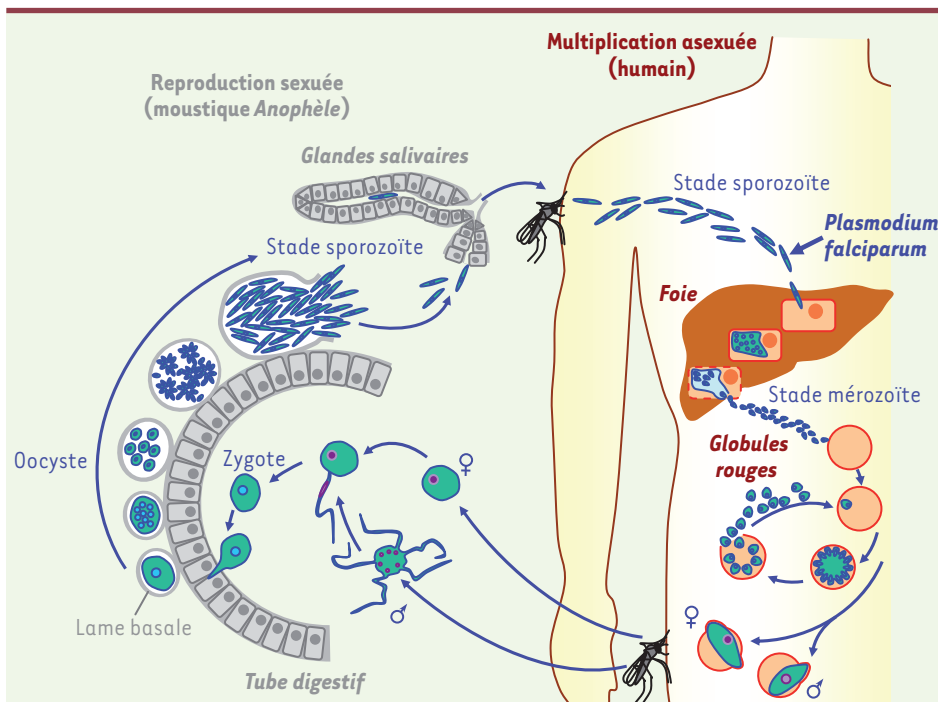


Figure 1. Cycle de vie de *Plasmodium falciparum*. Le parasite est un organisme eucaryote unicellulaire (un protiste) dont les stades infectieux sont appelés des « zoïtes ». *Plasmodium* infecte l'être humain sous une forme appelée sporozoïte suite à une piqûre par un moustique anophèle femelle. Après passage dans le foie (phase hépatique), le stade mérozoïte envahit les globules rouges (phase sanguine), à l'intérieur desquels il se différencie en stades appelés trophozoïtes et schizontes, qui sont libérés en grand nombre par éclatement des globules rouges avec une rythmicité d'environ 48 h. Les symptômes du paludisme sont liés à ces formes intraérythrocytaires asexuées. L'être humain est un hôte dans lequel le parasite se propage

par division asexuée : l'être humain est de ce fait qualifié d'hôte intermédiaire. Des gamétocytes mâles et femelles peuvent être ingérés par un nouveau moustique au cours d'un repas sanguin. Dans le tube digestif du moustique, la fécondation a lieu et donne naissance à un zygote. Le moustique qui accueille la reproduction asexuée est de ce fait l'hôte définitif. Le zygote se divise et génère un grand nombre de sporozoïtes qui migrent dans les glandes salivaires, prêts à être propagés chez un nouvel humain. À tous ces stades, la prolifération cellulaire est très importante : un patient peut contenir des centaines de millions à des centaines de milliards de parasites [34] avec un hématoctrite normal.

[2], les programmes mis en œuvre dans les années 1950 et 1960 dans les zones tropicales ont tous échoué.

Une raison des échecs est la fragilité de l'outillage thérapeutique, qui s'explique d'une part par la difficulté à développer un vaccin, d'autre part par l'apparition et la propagation de résistances aux médicaments disponibles. Concernant l'approche vaccinale, après de nombreuses tentatives infructueuses, les premiers résultats d'un essai clinique de grande ampleur, publiés en octobre 2011 dans le *New England Journal of Medicine* [3], sont encourageants. Selon cette étude réalisée dans 11 pays subsahariens, chez 6 000 enfants âgés de 5 à 17 mois qui ont reçu une primovaccination en trois injections et ont été suivis pendant un an, la fréquence des accès cliniques du paludisme (fièvres palustres) a été réduite de l'ordre de 55 %. Ce candidat vaccin antipaludique, le RTS,S/AS01 (GlaxoSmithKline Biologicals), peut donc partiellement contribuer à la protection des jeunes enfants contre les accès simples et les formes sévères du paludisme, avec un profil d'innocuité et de tolérance acceptable. Des données complémentaires seront fournies jusqu'à fin 2014 et documenteront le niveau d'efficacité du RTS,S/AS01. Ce vaccin pourrait, en fonction de ces données supplémentaires, être recommandé par l'OMS dès 2015. Si ce test clinique de phase 3 est le plus encourageant à ce jour, il convient de rester prudent quant à la proportion de patients qui ne sont pas protégés par le candidat vaccin. L'une des conséquences les plus dramatiques serait une pression évolutive favorisant les souches

parasitaires résistantes, ce qui rendrait le traitement inefficace.

Concernant le second type de traitement thérapeutique, utilisant des médicaments administrés par voie orale ou parentérale, des molécules autrefois largement utilisées, telles que la chloroquine, ont vu leur efficacité s'amenuiser au point de ne plus être employées pour les traitements préventifs dans la majorité des pays à risque. Les résistances de souches de *Plasmodium* sont apparues contre toutes les molécules commercialisées. La résistance à l'artémisinine [4] était redoutée et il avait été montré qu'elle pouvait apparaître dans des lignées de *Plasmodium* cultivées en laboratoire [5]. La présence de lignées de parasites moins sensibles à l'artémisinine est maintenant confirmée en Asie du Sud-Est [6, 7]. L'OMS déploie des efforts importants pour limiter la propagation de ces lignées en luttant contre les contrefaçons et contre l'utilisation de l'artémisinine en monothérapie.

L'avenir repose donc en très grande partie sur les efforts de développement de nouveaux antipaludiques agissant sur des cibles originales. Il faut veiller à intégrer ces candidats médicaments dans des associations (multithérapies) pour limiter les risques d'apparition

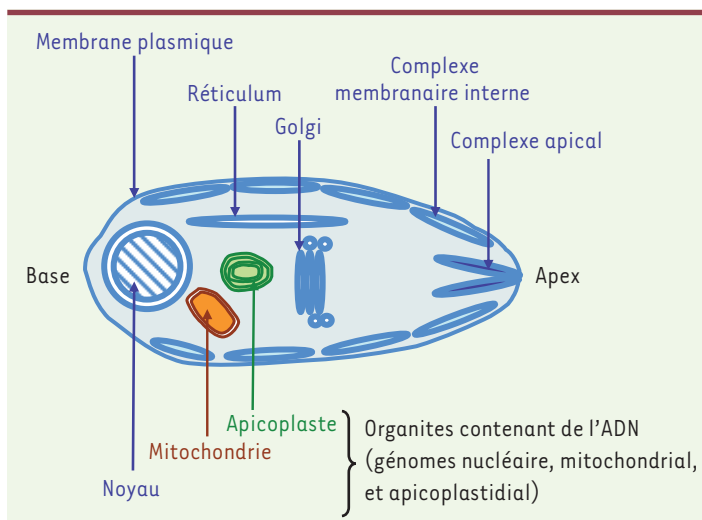


Figure 2. Schéma de la compartimentation membranaire dans une cellule de *Plasmodium falciparum*. Le schéma montre un « zoïte », cellule polarisée avec un complexe apical impliqué dans l'infection de cellules hôtes. La compartimentation membranaire est montrée et chaque structure correspond à ce qu'on appelle un organite. Parmi ces organites, ceux de couleur bleue font partie du système endomembranaire. Ce système comprend des structures telles qu'un réticulum connecté de façon dynamique à un appareil de Golgi, à l'enveloppe du noyau et à la membrane plasmique. Le système endomembranaire de *Plasmodium* comprend en plus un ensemble de sacs, juste sous la membrane plasmique, qui forment une structure qu'on appelle le complexe membranaire interne, commun à l'ensemble des protistes alvéolés. Le système endomembranaire comprend enfin différents compartiments du complexe apical. D'autres organites sont indépendants de ce système : la mitochondrie limitée par deux membranes, en brun, et l'apicoplaste limité par quatre membranes, en vert.

de résistances (la probabilité de voir apparaître, et donc de sélectionner, plusieurs locus de résistance simultanément au sein d'un même parasite étant infime) et préserver l'efficacité des combinaisons thérapeutiques le plus longtemps possible. Cette revue discute les recherches visant à identifier des candidats médicaments ayant une activité sur l'apicoplaste, qui ne représentent bien sûr qu'une part des efforts actuels dans ce domaine. Nous ne traitons pas de la recherche de molécules qui agissent sur des cibles localisées dans d'autres régions cellulaires des parasites Apicomplexes ou dans des structures élaborées dans les cellules hôtes après infection par ces parasites [36].

L'apicoplaste, une algue rouge « fossilisée » dans la cellule de *Plasmodium falciparum*

Il y a 15 ans, deux études réalisées par les groupes de Geoff McFadden de l'université de Melbourne et de David Roos de l'université de Pennsylvanie, publiées respectivement dans les revues *Nature* [8] et *Science* [9] ont bouleversé notre vision de *Plasmodium* dans « l'arbre de la vie » et ouvert un champ d'investigation nouveau pour la recherche de traitements antipaludiques. Ces études ont en effet montré qu'un

organite limité par quatre membranes, appelé apicoplaste était localisé à l'intérieur des cellules parasitaires et contenait un ADN circulaire proche de celui contenu dans le chloroplaste, un organite essentiel à la photosynthèse bien caractérisé chez les algues et les plantes (Figure 2). Cette découverte a suscité la curiosité de nombreux laboratoires dans le monde et tous les travaux engagés depuis montrent que l'apicoplaste est un « vestige » d'une algue unicellulaire.

Origine de l'apicoplaste, un scénario en deux étapes

Quel événement majeur de l'évolution a pu faire qu'un chloroplaste devienne un des constituants des cellules de *Plasmodium* et d'autres parasites Apicomplexa tels que *Toxoplasma*, *Babesia*¹ ou *Sarcocystis*² ? Les analyses de milliers d'organismes de la biodiversité, l'examen de la structure cellulaire des principaux groupes de protistes et les associations temporaires que l'on peut observer actuellement entre différents organismes unicellulaires, ont permis de déduire le scénario en deux étapes qui a conduit à l'apparition de l'apicoplaste. En tout premier lieu, il y eut l'apparition des organites simples (mitochondries et chloroplastes) dans les cellules à noyaux (les cellules eucaryotes), par un phénomène d'endosymbiose dite « primaire » (Figure 3A). Les données moléculaires montrent qu'il ne s'est produit qu'une endosymbiose primaire à l'origine de toutes les mitochondries trouvées dans toutes les cellules eucaryotes, après qu'une alpha-protéobactérie fut « avalée » par une cellule primitive [10] suivant un mécanisme proche de la phagocytose (du grec *phagos*, manger, et *kutos*, cellule). De même, un seul événement d'endosymbiose primaire est à l'origine de tous les chloroplastes, dits primaires, lorsqu'une cellule a « avalé » une cyanobactérie ancestrale. Les données biochimiques et structurales actuelles indiquent que les deux membranes qui limitaient l'alpha-protéobactérie ancestrale sont à l'origine des deux membranes de l'enveloppe mitochondriale, et les deux membranes qui limitaient la cyanobactérie ancestrale sont à l'origine des deux membranes de l'enveloppe chloroplastique [10]. La Figure 3A montre ainsi comment une algue rouge s'est construite. Chez de nombreux protistes, une endosymbiose dite secondaire s'est déroulée, un eucaryote dit secondaire ayant « avalé »

¹ Le genre *Babesia* constitue un large groupe de protozoaires à développement intraérythrocytaire. Ils sont transmis par la morsure d'une tique et infectent une large gamme de vertébrés dont l'homme, et surtout les patients splénectomisés. La babésiose provoque un syndrome pseudogrippal, et pour les cas graves une atteinte hépatique et rénale.

² Affecte essentiellement les ovins et les caprins (formation de kystes dans le muscle, pharynx, œsophage, etc.), les cas de contamination humaine sont rares.

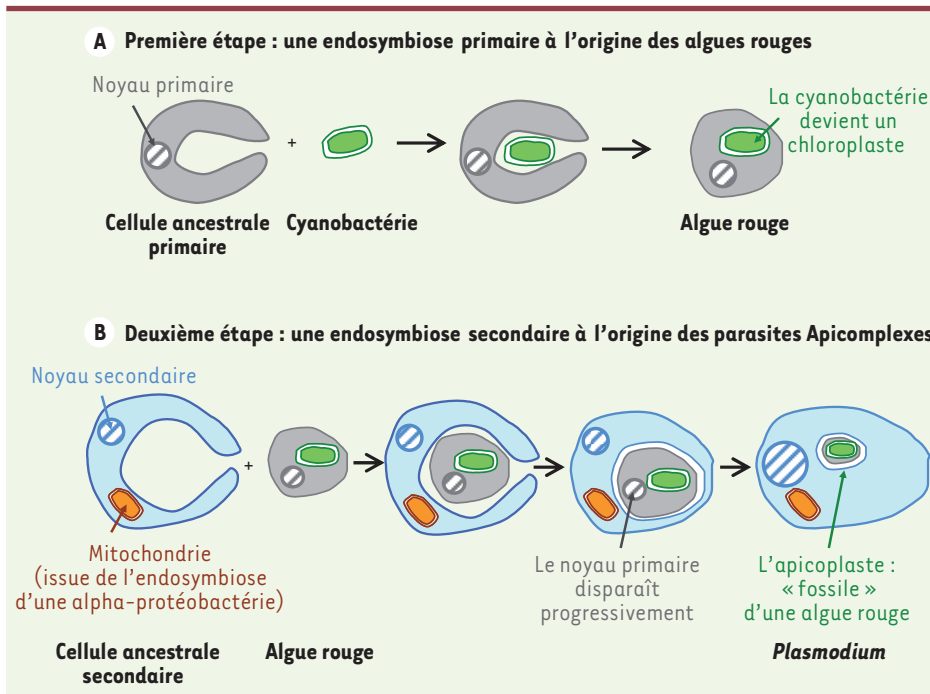


Figure 3. Origine des organites à l'intérieur des cellules de Plasmodium. A. Endosymbiose primaire. Un seul événement d'endosymbiose « primaire » s'est déroulé après qu'une cellule ancestrale primaire a ingéré une cyanobactérie. Il est important de noter qu'à la suite de cette première endosymbiose, les deux membranes délimitant le chloroplaste dérivent des deux membranes délimitant initialement la cyanobactérie. Cette association s'est maintenue au cours du temps, la cyanobactérie contribuant à la vie cellulaire en apportant entre autres la possibilité de réaliser la photosynthèse, mais aussi de synthétiser des acides gras, des vitamines, des isoprénoïdes, etc. Toutes les algues étudiées à ce jour, vertes, rouges ou

glauques, sont issues de cet événement unique. B. Endosymbiose secondaire. À plusieurs moments de l'évolution, des événements de nature semblable ont eu lieu, mais avec des cellules plus complexes. Un de ces événements d'endosymbiose dite « secondaire » a conduit une algue rouge à se maintenir dans une cellule eucaryote secondaire. À la suite de cette deuxième endosymbiose, les membranes délimitant le chloroplaste comprennent en plus des membranes issues du phagosome et de la membrane plasmique de l'algue rouge. Au cours du temps, l'association s'est maintenue, les éléments « redondants » ou « inutiles » des deux cellules ont disparu, et il ne reste aujourd'hui que l'apicoplaste limité par quatre membranes.

une algue (Figure 3B). Il existe plusieurs cas d'endosymbioses secondaires impliquant des algues vertes ou rouges. L'apicoplaste est issu d'un de ces événements, et les données moléculaires montrent qu'il provient d'une algue rouge. La symbiose a apporté un bénéfice aux deux organismes et s'est maintenue au cours de l'évolution, au point que des liens métaboliques se sont consolidés et que cette association est devenue indissociable. Au cours du temps, les structures inutiles ont disparu et, dans le cas des parasites Apicomplexes, il ne reste plus de l'algue ancestrale qu'un plaste réduit (Figure 3B). Une exception notable doit être mentionnée, celle de *Cryptosporidium*, un des rares Apicomplexa connus ayant finalement perdu son apicoplaste. Pour conclure ce mariage, des régions importantes de l'ADN du noyau et du plaste de l'algue rouge ont migré vers le noyau de l'hôte secondaire. Suite à ce processus d'inclusion cellulaire et d'incorporation d'ADN, il résulte que *Plasmodium* contient dans son génome nucléaire des centaines de gènes qui codent pour des protéines d'origine algale, qu'on ne retrouve pas chez l'humain, et qui représentent donc des cibles originales pour des médicaments nouveaux. Il faut bien entendu que ces protéines d'origine algale soient vitales pour le parasite.

L'apicoplaste est un organite vital

L'apicoplaste est-il indispensable à la survie des parasites ? La question est capitale, car pour que cet organite soit une cible thérapeutique, il faut démontrer que sa disparition provoque en effet

la mort du parasite. La réponse a été apportée en étudiant une lignée mutante de *Toxoplasma* ayant un défaut de division de l'apicoplaste [11]. Après une division cellulaire, les cellules filles possédant un apicoplaste survivent, et celles qui ne contiennent plus d'apicoplaste engagent une nouvelle division cellulaire, puis meurent (Figure 4C). Ce phénomène retrouvé chez *Plasmodium* a été appelé « mort cellulaire décalée ». La Figure 4 montre comment la division cellulaire de différents parasites s'accompagne toujours d'une division de l'apicoplaste. La « mort cellulaire décalée » est un moyen de tester si un antibiotique agit sur l'apicoplaste : à la différence des antiparasitaires à effet immédiat, l'activité de composés antiparasitaires agissant sur certaines fonctions de l'apicoplaste ne sera mesurable qu'au-delà d'une division cellulaire. Il est important de noter que toute perturbation des fonctions de l'apicoplaste n'entraîne pas obligatoirement cette mort décalée.

Les fonctions biologiques portées par l'apicoplaste

L'apicoplaste n'est pas chlorophyllien et la machinerie photosynthétique a été perdue au cours de l'évolution [12]. Chez les algues et les plantes, la

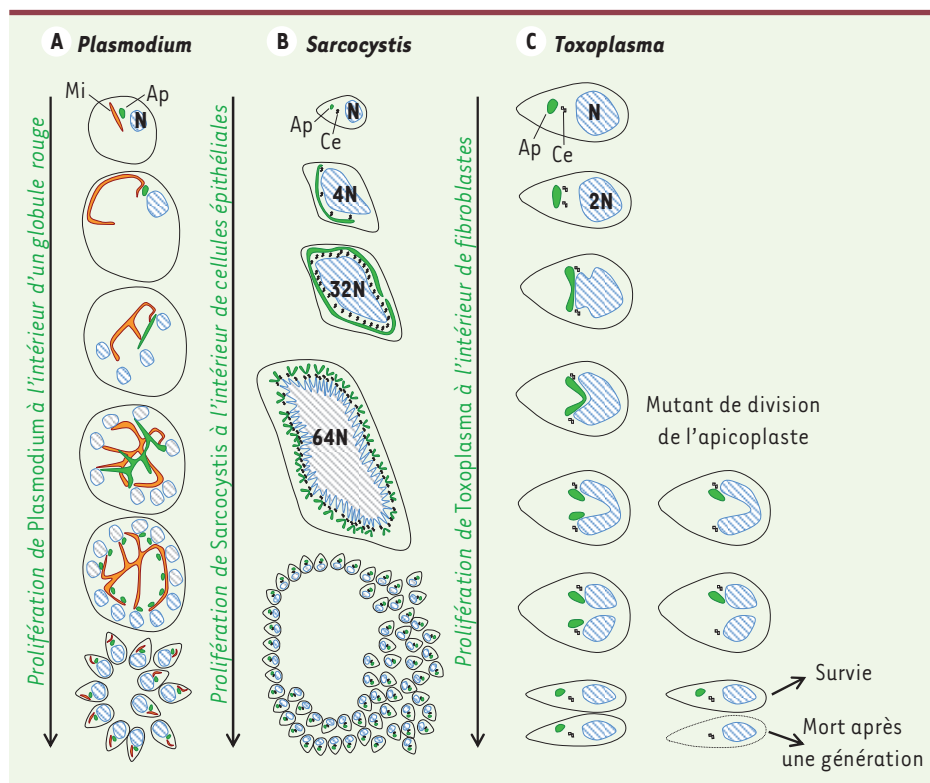


Figure 4. Synchronisation de la division de l'apicoplaste et de la division du noyau. L'apicoplaste est vital pour les parasites. Il n'en existe qu'un exemplaire dans les formes cellulaires dotées d'un seul noyau. Les parasites apicomplexes se divisent avec des processus très variés, illustrés ici chez *Plasmodium* (A), *Sarcocystis* (B) et *Toxoplasma* (C), au cours desquels il peut y avoir division des noyaux avant la division des cellules. Dans tous les cas, la division de la mitochondrie et celle de l'apicoplaste sont orchestrées de sorte que les cellules ont toujours un exemplaire de ces organites. Chez un mutant de *Toxoplasma* défectueux dans la division de l'apicoplaste (C), la cellule fille qui n'a pas hérité de cet organite meurt après une génération (phénomène de mort cellulaire décalée). Ce mutant [11] a permis de mettre en évidence que

l'apicoplaste était vital et sa disponibilité a stimulé la recherche de traitements antiparasitaires ciblant cet organite par de nombreuses équipes de recherche. Ap, apicoplaste (représenté en vert) ; Ce, centriole (en noir) ; Mi, mitochondrie (en brun) ; N, noyau (en bleu) (adapté de [35]).

photosynthèse n'est pas la seule fonction du plaste et certaines de ces autres activités métaboliques sont présentes chez l'apicoplaste. Le travail collaboratif de chercheurs en parasitologie et en biologie végétale a, de ce fait, permis d'accélérer la compréhension des parasites Apicomplexes et la recherche de traitements nouveaux. Dès 1998, le système multienzymatique de l'acide gras synthase bactérienne/chloroplastique de type II (FASII) a été identifié et localisé dans l'apicoplaste, bousculant le dogme selon lequel les *Apicomplexa* étaient incapables de synthétiser leurs acides gras *de novo* [13]. L'année suivante, il était montré que l'apicoplaste était capable de synthétiser un précurseur essentiel des isoprénoïdes³, suivant une voie métabolique connue chez les bactéries et les plastes [14]. Chez *P. falciparum*, des analyses bioinformatiques ont permis de prédire qu'un dixième des gènes nucléaires code pour des protéines de l'apicoplaste [15]. Les cibles possibles ont donc été recherchées dans cette part importante des produits du génome parasitaire.

Après une décennie de recherches, on considère que les molécules contrôlant deux grands aspects de la physiologie de l'organite peuvent être ciblées (Figure 5).

³ Les isoprénoïdes ou terpénoïdes constituent une vaste famille de substances naturelles dont le squelette carboné est composé d'un élément de base commun à cinq atomes de carbone et dérivé de l'isoprène (C₅). Ils sont présents chez tous les organismes vivants et leurs structures, propriétés physiques et chimiques, et activités biologiques sont très diverses (terpènes, phéromones, etc.).

Une première série de cibles comprend les processus de maintenance de l'organite, avec la machinerie moléculaire qui permet la réplication de l'ADN, la transcription en ARN et la traduction des ARN en protéines [16]. Des antibiotiques bloquant ces processus de production des protéines héritées de la cyanobactérie ancestrale ont été testés. Une seconde série de cibles comprend les voies du métabolisme qui sont localisées dans l'apicoplaste. Des molécules herbicides existent, qui sont capables de bloquer des voies équivalentes dans le chloroplaste des plantes, et ces molécules ont, à notre connaissance, été testées sur *Plasmodium*. C'est ainsi que les effets antipaludiques d'herbicides tels que l'haloxyfop ou la fosmidomycine ont été très vite repérés. Dans la plupart des cas, cependant, il n'existait pas de molécules connues pour inhiber les enzymes identifiées dans l'apicoplaste. Des programmes spécifiques de développement de candidats médicaments ont donc été imaginés. L'apicoplaste héberge en particulier quatre voies métaboliques uniques qui ont fait l'objet d'un examen plus poussé : la voie de synthèse des acides gras par FASII [13], la voie de synthèse des isoprénoïdes de type 1-déoxy-D-xylulose 5-phosphate (voie DOXP) [14],

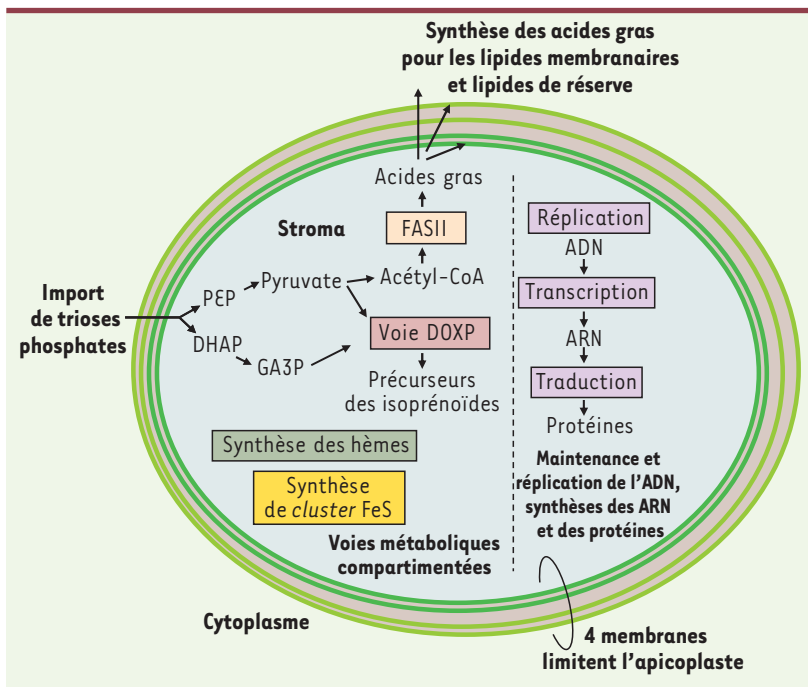


Figure 5. Fonctions biologiques portées par l'apicoplaste. L'apicoplaste contient l'ADN circulaire le plus petit connu pour un plaste (35 kilobases). Cet ADN est répliqué, transcrit en ARN qui est traduit en protéines par une machinerie propre héritée de la cyanobactérie ancestrale. Cette machinerie est donc une cible pour des antibiotiques. L'apicoplaste héberge de plus quatre voies métaboliques uniques : une voie de synthèse des acides gras par le système multienzymatique de l'acide gras synthase de type II (FASII), une voie de synthèse des isoprénoïdes de type 1-déoxy-D-xylulose 5-phosphate (voie DOXP), une voie de synthèse des hèmes et enfin une voie de synthèse de clusters fer/soufre (FeS). Les voies FASII et DOXP dépendent de l'import de trioses phosphates : le phosphoénoyl-pyruvate (PEP) et le dihydroxy-acéto-3-phosphate (DHAP), générés dans le cytosol et convertis en pyruvate, acétyl-CoA et glycéraldéhyde-3-phosphate (GA3P) dans l'apicoplaste. Toutes ces voies sont actuellement explorées

comme cibles pour développer de nouvelles molécules antiparasitaires. La voie de biosynthèse des acides gras semble essentielle uniquement au stade hépatique de *Plasmodium*. Seule la voie de biosynthèse des isoprénoïdes semble essentielle pendant la phase intraérythrocytaire.

une voie de synthèse des hèmes [17] et, enfin, une voie de synthèse de centres fer/soufre⁴ (FeS) [18] (Figure 5).

Molécules développées pour viser l'apicoplaste

Un premier groupe de molécules développées pour viser l'apicoplaste comprend les composés agissant sur la maintenance et la biologie de l'ADN contenu dans cet organite ; un second groupe comprend les composés agissant sur les voies métaboliques qui y sont localisées. Dans le premier groupe, de nombreux antibiotiques agissant sur la réplication, la transcription et la traduction, comme la ciprofloxacine [19, 20], la doxycycline [21] ou la rifampicine [22] (Tableau 1) ont été testés et ont montré une activité antipaludique. Il est intéressant de noter que la doxycycline agit en deux temps, avec un effet toxique immédiat et un effet toxique décalé, mesurable après une division cellulaire [23] : le premier effet est considéré comme non spécifique, agissant sur une cible qui n'est pas localisée dans l'apicoplaste ; le second effet est caractéristique de la « morte cellulaire décalée » telle qu'observée après un effet sur l'apicoplaste. La doxycycline, qui est actuellement prescrite dans certains cas de prévention antipaludique, est ainsi un médicament

multicible dont une part de l'action peut être attribuée à un effet sur l'apicoplaste de *Plasmodium* et une autre part à un effet sur des cibles dites collatérales [24].

Dans le second groupe, la recherche de candidats médicaments actifs sur la voie de synthèse des acides gras a été très active et a conduit à des résultats finalement difficiles à interpréter. La thiolactomycine [13], qui inhibe FabH et FabB/F, deux enzymes de la voie FASII, a une bonne activité contre *P. falciparum* [13]. L'agent antifongique et antibactérien triclosan [25, 26] inhibe quant à lui FabI *in vitro*, une autre enzyme de la voie FASII. Le triclosan et ses analogues sont apparus initialement comme des candidats médicaments potentiels, et de nombreux essais ont été réalisés chez la souris ; cependant, des études récentes ont mis en cause le mode d'action du triclosan (voir plus loin).

Pour la phase érythrocytaire, la biosynthèse des isoprénoïdes s'est finalement révélée comme la cible la plus prometteuse pour l'avenir. L'herbicide fosmidomycine [14] inhibe la 1-déoxy-D-xylulose-5-phosphate réducto-isomérase (aussi appelée DOXP réducto-isomérase ou DXR), enzyme clé de la voie de synthèse de l'isopentényl-pyrophosphate (IPP), motif de base des terpénoïdes. En 2011, Ellen Yeh et Joseph DeRisi [23] ont démontré de façon très élégante que la toxicité de la fosmidomycine sur la forme sanguine de *Plasmodium* pouvait précisément être levée par addition d'IPP dans le milieu. Dans ce milieu supplémenté en IPP et riche en

⁴ Les centres fer-soufre sont des assemblages d'atomes de fer et de soufre qu'on retrouve dans un nombre croissant d'enzymes chez tous les organismes vivants. Ce sont des catalyseurs fascinants qui participent à des réactions non-rédox (déshydratases, etc.), à des mécanismes de régulation de l'expression des gènes (aux niveaux transcriptionnel et traductionnel), à des chaînes de transfert d'électrons (respiration, photosynthèse, etc.) et, découverte plus récente, à des réactions rédox faisant intervenir une chimie radicalaire originale (biosynthèse des désoxyribonucléotides, réparation de l'ADN, biosynthèse de cofacteurs et vitamines, etc.). La synthèse de ces assemblages inorganiques dépend de machineries protéiques complexes fournissant et contrôlant les atomes de fer et de soufre (source : Marc Fontecave, séminaire du département de chimie, ENS).

Molécules candidates	Cibles	Effets
Maintenance et réplication de l'ADN, transcription et traduction		
Ciprofloxacine	Réplication de l'ADN	Immédiat
Rifampicine	Transcription	Retardé (?)
Doxycycline	Traduction	Retardé
Voies métaboliques compartimentées		
Triclosan	Synthèse des lipides (acide gras synthase de type II) et cible(s) non identifiée(s)	Immédiat
Thiolactomycine	Synthèse des lipides (acide gras synthase de type II) et cible(s) non identifiée(s)	Immédiat
Fosmidomycine	Biosynthèse des isoprénoïdes	Immédiat

Tableau 1. Exemples de molécules ciblant l'apicoplaste. Comparaison de quelques antibiotiques et de leurs effets sur *Plasmodium* [33]. Toutes ces molécules ont fait l'objet d'études en biologie et en chimie, pour inspirer de nouveaux traitements antipaludiques et tenter de développer de nouveaux analogues efficaces.

acides gras et en lipides, le parasite finit même par perdre son apicoplaste et poursuivre sa multiplication sans dommage apparent. Cette étude démontre d'une part que la fosmidomycine est très vraisemblablement monocible, d'autre part que la synthèse des isoprénoïdes est la fonction majeure remplie par l'apicoplaste, au moins pendant la phase érythrocytaire. Des essais chez l'homme ont été réalisés afin d'évaluer l'efficacité de cette molécule chez les patients infectés, ce qui a permis de valider partiellement son profil de tolérance.

Cible visée et cibles collatérales ?

Chaque développement d'un candidat médicament est une histoire longue, étalée sur une ou plusieurs décennies, bâtie sur des hypothèses qu'il faut souvent réexaminer, voire corriger, au vu des résultats surprenants qui jalonnent la caractérisation des composés développés et de leurs effets biologiques. À tout moment, si le composé s'avère peu efficace ou toxique pour le patient, l'histoire s'arrête. Comme nous l'avons mentionné plus haut, la recherche d'agents bloquant la biosynthèse des acides gras a conduit à des résultats contradictoires, en particulier dans le cas du triclosan, un composé connu pour bloquer l'enzyme FabI chez les bactéries (Tableau 1). En 2001, les équipes de R. McLeod [25] et de N. et A. Surolia [26] rapportent indépendamment que la croissance de *P. falciparum* est inhibée par le triclosan. L'efficacité *in vivo* a été initialement établie avec un effet curatif sur des souris infectées par *P. berghei*, traitées par des doses journalières d'environ 40 mg/kg [26]. Un immense effort a par la suite été fourni pour développer des analogues du triclosan qui seraient plus efficaces. En 2008 cependant, l'étude d'un mutant de *P. falciparum* chez lequel l'expression du gène codant pour FabI a été abolie, a montré de façon

non équivoque que le stade sanguin du parasite n'était pas affecté par l'absence de cette sous-unité de FASII [27]. Ce fut une surprise qui a fait douter des programmes de développement de molécules qui avaient été engagés, au point d'envisager que les progrès apparents de l'efficacité antipaludique des dérivés du triclosan étaient dus à un effet collatéral, portant sur une autre cible que FabI.

La question des cibles collatérales n'est pas le seul problème. Très récemment, une étude comparative d'essais *in vivo* sur des modèles murins [28] n'a pas permis de confirmer les effets curatifs du triclosan initialement rapportés suite à une infection par *P. berghei* [26], ce qui suggère que les essais initiaux étaient peut-être dus à des impuretés dans le lot de triclosan ou du solvant utilisé, ou encore à l'état physiologique des souris [24]. Les auteurs de cette étude concluent que les programmes de développement de

médicaments devraient être conduits exclusivement lorsque la cible, ici le système multienzymatique FASII, a été complètement validée par invalidation génétique. N. Surolia et A. Surolia [29] répondent que le triclosan a en effet montré des activités prometteuses dans des études indépendantes, et que FASII pourrait tout de même jouer un rôle vital dans des contextes physiologiques particuliers et pendant le stade hépatique (voir Figure 1). Au stade de la phase parasitaire sanguine, la propagation *in vitro* du parasite consiste à cultiver *Plasmodium* dans un milieu qui contient du sérum humain ou un substitut de sérum, enrichi en acides gras sous forme libre ou de triglycérides [30], ce qui rend difficile la démonstration de la nécessité ou non de la présence de FASII. Le régime nutritionnel des souris (et des humains) pourrait, de fait, avoir un impact sur le rôle vital de FASII. En effet, l'accès du parasite aux sucres et lipides varie en fonction du statut nutritionnel de l'hôte [31] et il est maintenant établi que les variations du métabolisme dans l'espèce humaine (ce qu'on appelle l'individualité métabolique) doivent être prises en compte dans la recherche pharmaceutique [32]. Il n'est pas aberrant de supposer que chez certains individus, *Plasmodium* pourrait avoir besoin d'une FASII au stade sanguin. Il est aujourd'hui établi qu'indépendamment d'un effet de l'individualité métabolique du patient, qui n'a pas été étudié à ce jour, et à la différence des composés bloquant la biosynthèse des isoprénoïdes au stade

sanguin, un rôle vital de la FASII n'a pu être démontré que pendant le stade hépatique de *Plasmodium*. Les développements futurs des agents bloquant la biosynthèse des acides gras pourraient ne trouver une application antipaludique que sur ce stade parasitaire.

Conclusion

Cette revue couvre sommairement une décennie de recherche de candidats médicaments visant à toucher le parasite responsable du paludisme au niveau de l'apicoplaste. Quinze ans après la découverte de l'apicoplaste et dix ans après la publication du génome complet de *P. falciparum*, nous sommes arrivés au bout d'une première phase de tests des antibiotiques et des herbicides disponibles. La spécificité de ces molécules actives et la validité des cibles protéiques restent à établir dans de nombreux cas. En conclusion, indépendamment du stade parasitaire, l'inhibition de protéines impliquées dans la biogenèse de l'apicoplaste bloque, indirectement, les fonctions vitales portées par cet organe : les travaux qui ont été réalisés nous indiquent que les antibiotiques agissant sur la machinerie moléculaire ADN/ARN de l'apicoplaste ont très vraisemblablement de multiples cibles. Concernant les voies métaboliques localisées dans l'apicoplaste, les agents bloquant la biosynthèse des acides gras, qui ont suscité beaucoup d'espoirs, ne seraient éventuellement efficaces qu'au stade hépatique et les agents bloquant la biosynthèse des isoprénoides, tels que les dérivés de la fosmidomycine, semblent les plus intéressants à étudier pour lutter contre la phase sanguine du parasite. ♦

SUMMARY

Targeting malaria parasite at the level of apicoplast : an update

In 1996, the discovery of a relic chloroplast in *Plasmodium* and *Toxoplasma* cells has strongly changed our vision of these parasites in the "Tree of Life", and has opened an unexpected new field of investigation in the search for antiparasitic treatments, including antimalarials. This review details our current understanding of the sophisticated evolution of the parasites of the *Apicomplexa* phylum and briefly covers a decade of research and development in drug discovery, trying to target the malaria parasite at the level of its plant-like organelle. Fifteen years after the discovery of the apicoplast and ten years after the publication of the genome of *Plasmodium falciparum*, it seems that we have completed a first phase of tests of available antibiotics and herbicides. In the human host, the liver phase is the only parasitic stage, for which biological functions harbored by the apicoplast, such as fatty acid biosynthesis, seem indispensable. During the erythrocytic phase, recent results have focused the attention on the processes controlling the biogenesis of the apicoplast, and one of the functions harbored by the apicoplast, *i.e.* the biosynthesis of isoprenoids, as major promising targets for future treatments. ♦

CONFLIT D'INTÉRÊTS

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. WHO. *World Malaria Report: 2010*. Geneva: World Health Organization, 2010.
2. Utzinger J, Tanner M, Kammen DM, et al. Integrated programme is key to malaria control. *Nature* 2002 ; 419 : 431.
3. Agnandji ST, Lell B, Soulanoudjingar SS, et al. First results of phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African children. *N Engl J Med* 2011 ; 365 : 1863-75.
4. Segura V. Génétique et amélioration d'*Artemisia annua* L. pour une production durable d'antipaludiques à base d'artémisinine. *Med Sci (Paris)* 2010 ; 26 : 701-3.
5. Afonso A, Hunt P, Cheesman S, et al. Malaria parasites can develop stable resistance to artemisinin but lack mutations in candidate genes *atp6* (encoding the sarcoplasmic and endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase), *tctp*, *mdr1*, and *cg10*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006 ; 50 : 480-9.
6. Noedl H, Se Y, Schaefer K, et al. Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. *N Engl J Med* 2008 ; 359 : 2619-20.
7. Maude RJ, Woodrow CJ, White LJ. Artemisinin antimalarials: preserving the magic bullet. *Drug Dev Res* 2010 ; 71 : 12-9.
8. McFadden GI, Reith ME, Munholland J, Lang-Unnasch N. Plastid in human parasites. *Nature* 1996 ; 381 : 482.
9. Kohler S, Delwiche CF, Denny PW, et al. A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites. *Science* 1997 ; 275 : 1485-9.
10. Cavalier-Smith T. Membrane heredity and early chloroplast evolution. *Trends Plant Sci* 2000 ; 5 : 174-82.
11. He CY, Shaw MK, Pletcher CH, et al. A plastid segregation defect in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *EMBO J* 2001 ; 20 : 330-9.
12. Marechal E, Cesbron-Delauw MF. The apicoplast: a new member of the plastid family. *Trends Plant Sci* 2001 ; 6 : 200-5.
13. Waller RF, Keeling PJ, Donald RG, et al. Nuclear-encoded proteins target to the plastid in *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 ; 95 : 12352-7.
14. Jomaa H, Wiesner J, Sanderbrand S, et al. Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. *Science* 1999 ; 285 : 1573-6.
15. Zuegge J, Ralph S, Schmuker M, et al. Deciphering apicoplast targeting signals: feature extraction from nuclear-encoded precursors of *Plasmodium falciparum* apicoplast proteins. *Gene* 2001 ; 280 : 19-26.
16. Fleige T, Soldati-Favre D. Targeting the transcriptional and translational machinery of the endosymbiotic organelle in apicomplexans. *Curr Drug Targets* 2008 ; 9 : 948-56.
17. Van Dooren GG, Marti M, Tonkin CJ, et al. Development of the endoplasmic reticulum, mitochondrion and apicoplast during the asexual life cycle of *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* 2005 ; 57 : 405-19.
18. Seeber F. Biosynthetic pathways of plastid-derived organelles as potential drug targets against parasitic Apicomplexa. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2003 ; 3 : 99-109.
19. Fichera ME, Roos DS. A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. *Nature* 1997 ; 390 : 407-9.
20. Dahl EL, Rosenthal PJ. Multiple antibiotics exert delayed effects against the *Plasmodium falciparum* apicoplast. *Antimicrob Agents Chemother* 2007 ; 51 : 3485-90.
21. Gras C, Laroche R, Guelain J, et al. Place actuelle de la doxycycline dans la chimioprophylaxie du paludisme à *Plasmodium falciparum*. *Bull Soc Pathol Exot* 1993 ; 86 : 52-5.
22. Tarun AS, Peng X, Dumpit RF, et al. A combined transcriptome and proteome survey of malaria parasite liver stages. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008 ; 105 : 305-10.
23. Yeh E, DeRisi JL. Chemical rescue of malaria parasites lacking an apicoplast defines organelle function in blood-stage *Plasmodium falciparum*. *PLoS Biol* 2011 ; 9 : e1001138.
24. Botte CY, Dubar F, McFadden GI, et al. *Plasmodium falciparum* apicoplast drugs: targets or off-targets? *Chem Rev* 2011 ; 25 octobre (online). DOI : 10.1021/cr200258w.
25. McLeod R, Muench SP, Rafferty JB, et al. Triclosan inhibits the growth of *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii* by inhibition of apicomplexan Fab I. *Int J Parasitol* 2001 ; 31 : 109-13.
26. Suroliya N, Suroliya A. Triclosan offers protection against blood stages of malaria by inhibiting enoyl-ACP reductase of *Plasmodium falciparum*. *Nat Med* 2001 ; 7 : 167-73.

RÉFÉRENCES

27. Yu M, Kumar TR, Nkrumah LJ, *et al.* The fatty acid biosynthesis enzyme FabI plays a key role in the development of liver-stage malarial parasites. *Cell Host Microbe* 2008 ; 4 : 567-78.
28. Baschong W, Wittlin S, Inglis KA, *et al.* Triclosan is minimally effective in rodent malaria models. *Nat Med* 2011 ; 17 : 33-4.
29. Surolia A, Surolia N. Triclosan is minimally effective in rodent malaria models. Reply. *Nat Med* 2011 ; 17 : 34-5.
30. Frankland S, Elliott SR, Yosaatmadja F, *et al.* Serum lipoproteins promote efficient presentation of the malaria virulence protein PfEMP1 at the erythrocyte surface. *Eukaryot Cell* 2007 ; 6 : 1584-94.
31. Katan MB, Zock PL, Mensink RP. Effects of fats and fatty acids on blood lipids in humans: an overview. *Am J Clin Nutr* 1994 ; 60 : S1017-22.
32. Suhre K, Shin SY, Petersen AK, *et al.* Human metabolic individuality in biomedical and pharmaceutical research. *Nature* 2011 ; 477 : 54-60.
33. Pradel G, Schlitzer M. Antibiotics in malaria therapy and their effect on the parasite apicoplast. *Curr Mol Med* ; 10 : 335-49.
34. Marechal E, Riou M, Kerboeuf D, *et al.* Membrane lipidomics for the discovery of new antiparasitic drug targets. *Trends Parasitol* 2011 ; 27 : 496-504.
35. Bisanz C, Botté C, Saïdani N, *et al.* Structure, function and biogenesis of the secondary plastid of apicomplexan parasites. In : Schoefs B, ed. *Current research in plant cell compartments*. Kerala : Research Signpost Publ, 2008 : 393-423.
36. Pino P, Soldati-Favre D. Invasion et réplication chez les Apicomplexes : tous les chemins mènent à ROM. *Med Sci (Paris)* 2011 ; 27 : 576-8

TIRÉS À PART

E. Maréchal

Toujours d'actualité

www.medecinesciences.org

ANTICORPS MONOCLONAUX EN THÉRAPEUTIQUE

De la conception à la production
La réalité clinique
Un futur en développement

Coordinateurs : Alain Beck,
Jean-Luc Teillaud, Hervé Watier

Tout ce que vous avez toujours voulu savoir sur les anticorps monoclonaux en thérapeutique... dans M/S

Tout ce que vous avez toujours voulu savoir sur les anticorps monoclonaux en thérapeutique... dans *Médecine/Sciences*. Pourquoi un numéro spécial de *Médecine/Sciences* sur les anticorps monoclonaux thérapeutiques ? Il nous a semblé que le moment était venu de dresser un état des lieux de ces biomédicaments qui prennent désormais une place considérable - et croissante - dans les traitements de maladies souvent lourdes et désespérantes. Ce voyage que nous vous proposons à la découverte du monde des anticorps thérapeutiques nous a appris, ou plutôt rappelé, une évidence : les compétences en France sont fortes et nombreuses, qu'elles soient académiques ou industrielles, biotechnologiques ou cliniques. Le paysage français, trop longtemps discret, bruisse désormais de mille initiatives balayant de multiples aspects des anticorps thérapeutiques : études précliniques et cliniques menées avec de nouveaux anticorps dirigés contre des cibles originales, développement de nouveaux formats d'anticorps ou d'anticorps optimisés reposant sur des études structurales et fonctionnelles sophistiquées, recherche active de cibles pertinentes, mise au point de méthodologies de bioproduction, de couplage, etc. L'expansion industrielle rapide de ce champ est un défi que peut et doit relever notre pays, défi tant scientifique qu'économique, avec ses combats pour la propriété intellectuelle et pour l'emploi de nos jeunes scientifiques.

Alain Beck, Jean-Luc Teillaud, Hervé Watier

Bon de commande

À retourner à EDK, 25, rue Daviel - 75013 Paris, France

Tél. : 01 58 10 19 05 - Fax : 01 43 29 32 62 - E-mail : edk@edk.fr

NOM : Prénom :

Adresse :

Code postal : Ville :

Pays :

Fonction :

Je souhaite recevoir M/S n° 12 - décembre 2009 (Anticorps monoclonaux en thérapeutique) : 25 € + 3 € de port = 28 € TTC

en exemplaire, soit un total de €

 Par chèque, à l'ordre de E D K Par carte bancaire : Visa Eurocard/Mastercard

Carte n° | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Date d'expiration : | | | | | | | |

N° de contrôle au dos de la carte : | | | | | | | |

Signature :