

Un nouvel espoir contre le paludisme

L'apport de la chimie bioorganométallique

Christophe Biot et Daniel Dive

Résumé Emblème de la bioorganométallique, la ferroquine est le candidat médicament organométallique le plus avancé dans son développement industriel et devrait achever des études cliniques de phase II comme traitement du paludisme non compliqué. Ce composé à base de ferrocène est extrêmement actif contre des isolats et/ou des clones de *Plasmodium falciparum* sensibles ou résistants à l'antipaludique le plus utilisé, la chloroquine, et contre *Plasmodium vivax*. Cet article résume la découverte de la ferroquine, son activité antipaludique, les hypothèses liées à son mode d'action et l'absence actuelle de résistance *in vitro*.

Mots-clés Paludisme, candidat médicament, ferroquine, mécanisme d'action, résistance.

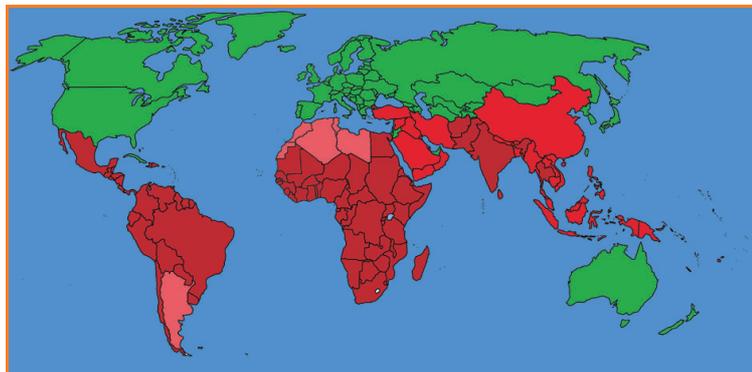
Abstract **A new hope against malaria: the contribution of organometallic chemistry**
Emblem of bioorganometallics, ferroquine is the most advanced organometallic drug candidate and about to complete phase II clinical trials as a treatment for uncomplicated malaria. This ferrocene-containing compound is active against both susceptible and resistant *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* strains and/or isolates to the most used drug, chloroquine. This article sums up the discovery of ferroquine, its antimalarial activity, the hypothesis of its mode of action and the current absence of resistance *in vitro*.

Keywords Malaria, drug candidate, ferroquine, mechanism of action, resistance.

Le problème du paludisme

40 % de la population mondiale est située dans une zone infectée par le paludisme. Cette endémie atteindrait 300 à 500 millions de cas cliniques par an dont 90 % en Afrique [1], et près d'un million de décès lui seraient imputables, principalement chez les enfants de moins de cinq ans. Une telle incidence clinique a de très sérieuses conséquences pour les pays concernés. Le poids économique du paludisme se compte en points de PIB perdus, c'est une entrave au développement et un facteur important de pauvreté dans toutes les régions où il sévit particulièrement. Les pays situés en dehors des zones d'endémie sont également concernés par un « paludisme d'importation » : plus de 4 000 cas sont ainsi dénombrés chaque année en France métropolitaine, dont une vingtaine mortels.

Le paludisme est une parasitose aiguë ou chronique due à un protozoaire du genre *Plasmodium* qui est transmis à l'homme par un moustique, l'anophèle femelle. Cinq espèces de *Plasmodium* sont pathogènes pour l'homme. Si *Plasmodium falciparum* est la forme la plus fréquemment mortelle, *Plasmodium vivax* est la plus répandue et, en dehors de cas létaux reconnus mais peu fréquents, elle présente souvent des symptômes cliniques plus sévères et plus invalidants que ceux des accès simples⁽¹⁾ à *P. falciparum*. Le cycle du parasite est complexe et constitué de deux phases. Chez l'homme, les formes infectantes de *Plasmodium*, injectées par le moustique avec sa salive lors de la piqûre, circulent dans le sang pour infecter les cellules du foie où elles vont se multiplier, donner des formes capables d'envahir les hématies dans lesquelles elles se développent (figure 1), avant de les faire éclater. Certains



40 % de la population mondiale est située dans une zone infectée par le paludisme, maladie transmise à l'homme par un moustique, l'anophèle femelle.

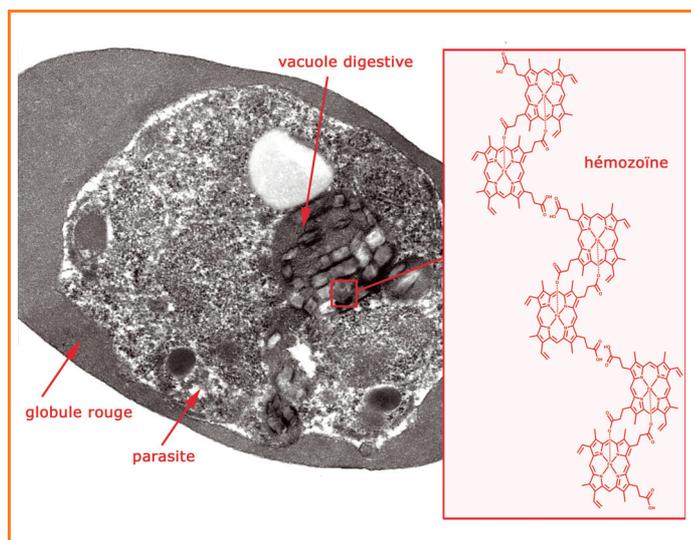


Figure 1 - Globule rouge infecté par *Plasmodium falciparum* vu en microscopie électronique à transmission. À droite : structure chimique de l'hémozoïne.

parasites envahissant les hématies vont se différencier en gamétocytes, qui vont être absorbés par le moustique lors d'un repas de sang. Chez l'anophèle, la phase sexuée aboutit à la formation d'un oocyste à l'origine de nombreuses formes infectantes pour l'homme, qui vont coloniser les glandes salivaires de l'insecte. La grande majorité des antipaludiques actuels, comme la chloroquine (figure 2), agissent sur les stades de « colonisation » et de « multiplication » dans les hématies de l'homme.

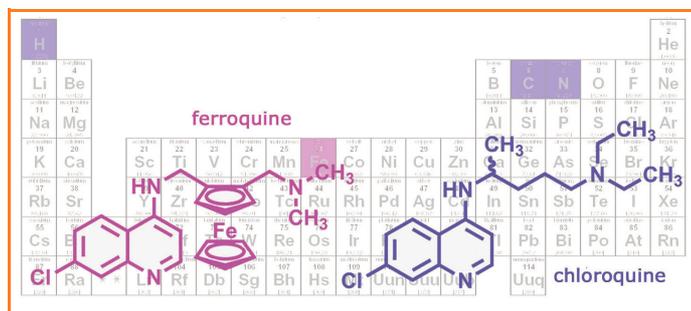


Figure 2 - De la chloroquine à la ferroquine.

Dans les années 40, l'introduction des insecticides organochlorés permettant de lutter contre les moustiques vecteurs et l'efficacité de la chloroquine ont fait naître l'espoir de pouvoir contrôler un jour le paludisme. Cependant, dès la fin des années 50, l'apparition de moustiques et de parasites résistant aux traitements a ruiné ces espérances. La résistance de *P. falciparum* est devenue un phénomène de santé publique d'autant plus préoccupant qu'elle concerne la chloroquine, antipaludique le plus utilisé et le moins cher. Ce problème de chloroquino-résistance est compliqué par l'émergence de la chimiorésistance aux autres antipaludiques introduits pour remplacer la chloroquine, conséquence à la fois des résistances croisées entre molécules, de la pression médicamenteuse consécutive à une utilisation des molécules en prophylaxie⁽²⁾ et en thérapeutique, et de la circulation de nombreuses contrefaçons insuffisamment dosées. Pour faire face à ces problèmes préoccupants, il est urgent de trouver de nouvelles molécules qui soient efficaces seules, ou mieux

en association, pour retarder les phénomènes d'apparition de résistance.

De la chloroquine à la ferroquine

Nos recherches ont débuté dans le milieu des années 90 sur ce constat. L'idée était de trouver une molécule différente de celles utilisées alors, plus active et dépourvue de leurs inconvénients. De nombreux travaux ayant cet objectif avaient été et sont encore consacrés à la recherche de nouvelles molécules purement organiques.

Une approche différente fondée sur l'introduction de groupements organométalliques dans un médicament avait été proposée par le professeur Gérard Jaouen pour des anticancéreux tels que le tamoxifène [2]. Depuis ces travaux fondateurs, l'incursion de la chimie organométallique en biosciences est devenue une discipline dite bioorganométallique. La similarité entre certains mécanismes de résistance du parasite avec ceux des cellules cancéreuses et l'ignorance à cette époque du mécanisme précis de résistance à la chloroquine chez *P. falciparum* nous ont amenés à appliquer cette stratégie innovante aux principales classes d'antipaludiques.

Le choix du ferrocène – pour lequel deux cycles à cinq carbones enserrant un atome de fer – comme organométallique a été dicté par ses propriétés physico-chimiques : sa lipophilie élevée et son comportement redox (dû au couple ferrocène/ferrocinium) le rendent très attractif pour la conception de médicaments.

Très rapidement, toute une série de molécules ont été synthétisées, en même temps qu'un ensemble de relations qualitatives entre leurs structures et leurs activités biologiques ont pu être établies. Parmi plus de cent molécules synthétisées et testées, la ferroquine (figure 2) s'est très vite imposée comme le meilleur candidat pour un développement industriel [3]. La synthèse de cette molécule est simple et d'un coût économique relativement faible, ce qui la rend d'autant plus attractive car elle est destinée essentiellement aux pays les plus pauvres du globe, parmi lesquels on relève précisément la plupart de ceux qui sont les plus directement touchés par le paludisme. La ferroquine est très efficace à très faible concentration (au niveau nanomolaire), non seulement sur des clones de *P. falciparum* sensibles, mais également sur ceux résistants à la chloroquine. Cette haute activité a été confirmée *in vitro* sur des isolats obtenus dans les zones endémiques. Testée *in vivo* sur plusieurs souches de *Plasmodium* de rongeurs dont une souche de *P. vinckei* résistante à la chloroquine, la ferroquine a montré une activité curative à la fois par voie sous-cutanée et par voie orale. Elle n'est pas toxique selon les critères établis dans les différents tests d'ADME (« Absorption, Distribution, Métabolisme et Excrétion ») et de toxicologie dont elle a fait l'objet.

La ferroquine (nom de code SSR97193) est entrée en développement clinique de phase I chez Sanofi-Aventis en 2004. Conformément aux réglementations de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), afin de limiter l'apparition des résistances, il a été choisi de développer la ferroquine en combinaison avec l'artésunate (un analogue semi-synthétique de l'artémisinine, antipaludique issu de la pharmacopée chinoise). Après des études cliniques de phase I sur des sujets sains ou des patients asymptomatiques, puis de phase IIa sur des patients adultes atteints de paludisme non compliqué, une étude clinique de phase IIb conduite dans sept pays africains, incluant plus de 400 adultes, adolescents et enfants atteints de paludisme non compliqué, a été lancée en octobre 2009. De plus, la ferroquine pourrait également remplacer la

chloroquine dans les cas d'infection à *P. vivax* résistant à la chloroquine [4].

Un mécanisme d'action original

Tout d'abord, il a été possible d'établir un parallèle entre les mécanismes d'action de la chloroquine et de la ferroquine : ces molécules exerceraient leur action en interférant avec le processus de détoxification de l'hème par le parasite [5]. Lors de la phase érythrocytaire, le parasite se développe à l'intérieur des globules rouges humains (figure 1). Il dégrade alors l'hémoglobine (constituant majeur des globules rouges), non seulement pour se fournir en acides aminés, mais aussi pour faire la place nécessaire à sa croissance et à sa division tout en maintenant la balance osmotique de la cellule-hôte. L'hème libéré lors de ce processus est dangereux pour le parasite à cause de son pouvoir oxydant puissant. *Plasmodium* est capable de provoquer une biominéralisation de l'hème en hémozoïne (figure 1), dont le dimère non toxique est le résultat de ce processus de détoxification. Les antipaludiques de type amino-4-quinoléine (dont font partie la chloroquine et la ferroquine) présentent à la fois des propriétés d'accumulation sélective dans l'hématie parasitée et une localisation préférentielle dans la vacuole digestive où s'effectue la biominéralisation de l'hème. Leur action inhibitrice sur la formation de l'hémozoïne a été démontrée [5].

Ensuite, et de façon tout à fait originale, la ferroquine pourrait également agir, *via* la chimie du ferrocène, en générant (directement ou indirectement) des radicaux libres [6] (figure 3). La vacuole digestive du parasite rassemble les conditions optimales (milieu acide et oxydant) pour catalyser la formation de radicaux hydroxyles à partir de l'eau oxygénée qui y est présente, par une réaction de Fenton catalysée par le fer du ferrocène. Cette production serait létale pour le parasite. En effet, ces radicaux sont connus pour engendrer de graves dommages sur toutes les molécules biologiques, en particulier la peroxydation extensive des acides gras polyinsaturés présents dans les membranes. Il a été également supposé que la ferroquine, en inhibant la formation de l'hémozoïne, conduirait à maintenir dans la vacuole digestive une concentration létale d'hème dont la nature amphiphile aurait pour conséquence de renforcer son action déstabilisante sur la membrane vacuolaire, conduisant à la lyse membranaire [7].

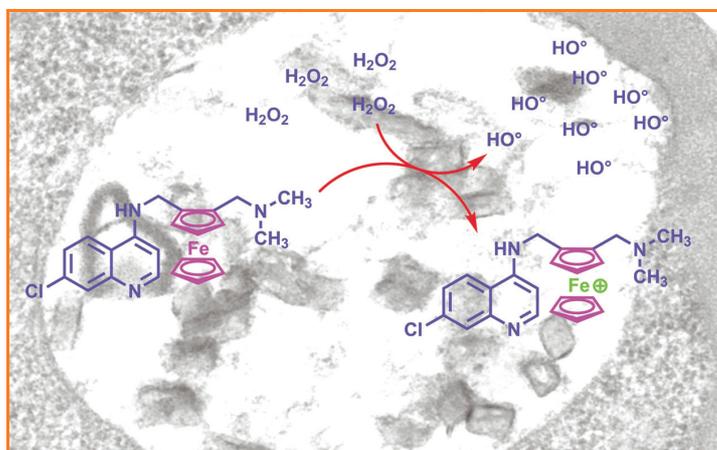


Figure 3 - Production de radicaux hydroxyles par la ferroquine.

L'importance de la liaison hydrogène intramoléculaire présente dans la ferroquine a été mise en évidence. Cette liaison offre à la ferroquine non seulement la possibilité d'un transport plus efficace, mais lui permet surtout d'échapper aux mécanismes de résistance aux aminoquinoléines [7].

Enfin, il a été suggéré que la présence du ferrocène hydrophobe permettait une localisation préférentielle au niveau du site de nucléation de l'hémozoïne, renforçant son action délétère sur le parasite.

Pour l'instant... pas de résistance !

Il est important de souligner la très nette différence entre les mécanismes de résistance potentielle à la ferroquine et à la chloroquine [8]. Au laboratoire, il n'a pas été possible d'obtenir un clone résistant à la ferroquine, alors que cette induction est possible avec la majorité des antipaludiques. La résistance à la ferroquine représente, pour *Plasmodium*, un coût biologique très élevé et s'accompagne d'une très forte baisse ou même d'une perte du pouvoir pathogène, sans pour autant pouvoir se transmettre par mécanisme génétique. De plus, la ferroquine n'interagit pas avec les protéines de transport connues pour conférer des résistances aux principaux antipaludiques. La probabilité de sélection et l'émergence, sur le terrain, de clones résistants à la ferroquine utilisée en chimiothérapie est très faible.

Un futur prometteur...

Par comparaison à la chloroquine, la présence du ferrocène engendre une modification : (i) de la forme, (ii) du volume, (iii) de la lipophilie, (iv) de la basicité, et (v) des propriétés électrochimiques, qui vont dès lors modifier le profil pharmacochimique de la ferroquine. Toutes ces propriétés pourraient expliquer la remarquable activité de ce nouvel antipaludique vis-à-vis des souches de terrain ou des clones résistants à la chloroquine.

Les développements futurs de la ferroquine constituent un énorme espoir pour les populations infectées par le paludisme.

L'état actuel de nos connaissances nous laisse supposer un comportement de la ferroquine qui la mettrait à l'abri d'une interaction avec les systèmes de transports impliqués dans la résistance, mécanisme que nous nous efforçons de démontrer. Si ce concept était vérifié, il pourrait trouver d'autres applications pour d'autres organismes pathogènes où des mécanismes semblables sont impliqués, et peut-être même pour certaines formes de cancer, si on peut adapter le ciblage du médicament au compartiment cellulaire impliqué.

Remerciements

Les auteurs remercient sincèrement tous ceux qui ont cru en ce projet scientifique et l'ont soutenu depuis 1994, tous les co-auteurs des articles et les doctorants qui ont contribué au projet. Ils remercient également leurs tutelles, ainsi que Pierre Fabre Médicament et Sanofi-Aventis pour leur soutien financier, et Christian Slomianny pour les photographies en microscopie électronique à transmission.

Notes et références

- (1) Il faut distinguer les accès simples des accès sévères pouvant conduire à la mort.
- (2) *Prophylaxie* : ensemble de moyens médicaux mis en œuvre pour empêcher l'apparition, l'aggravation ou l'extension des maladies.
- [1] *Guidelines for the treatment of malaria*, World Health Organization, **2010**. La seconde édition vient d'être publiée et elle est consultable librement sur http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547925_eng.pdf.
- [2] Top S., Tang J., Vessières A., Carrez D., Provot C., Jaouen G., Ferrocenyl hydroxytamoxifen: a prototype for a new range of oestradial receptor site-directed cytotoxics, *Chem. Commun.*, **1996**, 8, p. 955.
- [3] Dive D., Biot C., Ferrocene conjugates of chloroquine and other antimalarials: the development of ferroquine, the new antimalarial, *ChemMedChem*, **2008**, 3, p. 383.
- [4] Leimanis M.L. et al., *Plasmodium vivax* susceptibility to ferroquine, *Antimicrobial Agents in Chemotherapy*, **2010**, 54(5), p. 2228.
- [5] Biot C. et al, Insights into the mechanism of action of ferroquine. Relationship between physicochemical properties and antiplasmodial activity, *Mol. Pharmaceutics*, **2005**, 2, p. 185.
- [6] Chavain N., Vezin H., Dive D., Touati N., Paul J.-F., Buisine E., Biot C., Investigation of the redox behavior of ferroquine, a new antimalarial, *Mol. Pharmaceutics*, **2008**, 5, p. 710.
- [7] Dubar F. et al., The antimalarial ferroquine: role of the metal and intramolecular hydrogen bond in activity and resistance, *ACS Chem. Biol.*, **2011**, 6(3), p. 275.
- [8] Daher W., Biot C., Fandeur T., Jouin H., Pelinski L., Viscogliosi E., Fraisse L., Pradines B., Brocard J., Khalife J., Dive D., Assessment of

Plasmodium falciparum resistance to ferroquine (SSR97193) on field isolates and in W2 strain under pressure, *Malaria Journal*, **2006**, 5, p. 11.



C. Biot

Christophe Biot (*auteur correspondant*)

est maître de conférences à l'Université de Lille 1*.

Daniel Dive

était directeur de recherche Inserm à l'Institut Pasteur de Lille** avant de prendre sa retraite il y a quelques mois.



D. Dive

* Université de Lille 1, Unité de Glycobiologie structurale et fonctionnelle, UMR CNRS 8576, Bâtiment C9, F-59650 Villeneuve d'Ascq Cedex.

Courriel : christophe.biot@univ-lille1.fr

** CIIL, Inserm U 1019, UMR CNRS 8024, Université Lille Nord de France, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Pr Calmette, F-59019 Lille Cedex.

WE
CAPTURE
WHAT
MOVES

 MANE

Molecules

We interpret
nature
to deliver our vision
of natural
flavours & fragrances,
using both
biotechnologies
and new
synthetic molecules.