

Les cibles pharmacologiques potentielles des maladies opportunistes

Au cours de l'expertise, la recherche de cibles pharmacologiques communes à différents agents responsables des maladies opportunistes a été considérée comme l'une des stratégies à adopter pour la conception et le développement de nouvelles molécules.

Pneumocystose

Des recherches visant au développement de nouvelles stratégies de lutte contre la pneumocystose sont actuellement entreprises par plusieurs équipes. Elles comprennent d'une part l'étude en détail du phénomène *Ailler*, et d'autre part l'identification de cibles métaboliques spécifiques de *Pneumocystis*.

La constatation récente de l'effet inhibiteur d'une toxine *Killer* produite par la levure *Pichia anomale*, sur l'attachement et sur l'infectivité de *P. carinii*, permet d'envisager des nouvelles stratégies thérapeutiques et préventives (Séguy et coll., 1994, 1996; Cailliez et coll., 1994). Comme les toxines *Killer* de levure ne peuvent être utilisées directement chez l'hôte en raison de leur toxicité et de leur immunogénicité, une stratégie de recherche différente a été entreprise. Elle fait appel au phénomène *Killer* (Polonelli et coll., 1991). Son principe repose sur l'utilisation d'anticorps anti-idiotypiques (antiIds) possédant les propriétés *Killer* de la toxine de *P. anomale*. Cette stratégie a déjà été utilisée avec succès dans le domaine des candidoses expérimentales (Polonelli et coll., 1993, 1994) et représente à l'heure actuelle une perspective originale et intéressante dans le domaine des pneumocystoses et autres parasitoses et mycoses opportunistes.

La recherche de cibles métaboliques spécifiques de *Pneumocystis* a conduit à l'étude d'enzymes clés participant à la biosynthèse pariétale, aux métabolismes des sucres, stérols, acides aminés aromatiques et molécules antioxydantes.

Le groupe d'Ann Wakefield (Oxford) a cloné et séquencé le locus AROM, essentiel pour la biosynthèse d'acides aminés aromatiques chez *Pneumocystis* (Banerji et coll., 1993, 1994). Le même groupe, en collaboration avec Helen Jackson de GLAXO (Londres) a récemment abordé l'étude de la phosphomannose isomérase (PMI) du parasite (Chong et coll., 1994), enzyme impliquée dans la synthèse de la paroi cellulaire.

Pneumocystis se trouve dans un environnement riche en phospholipides et serait capable d'incorporer et d'utiliser des lipides exogènes (Sleight et coll., 1994). Cette hypothèse avait déjà été proposée sur la base d'observations ultrastructurales (Palluault et coll., 1992). Ellis et coll. (1994) ont montré la présence, chez *Pneumocystis*, d'un acide gras particulier, le *cis*-9,10 epoxy stéarate, présent seulement chez les Uredinales, groupe de champignons sans ergostérol (comme *P. carinii*). Cet acide gras serait synthétisé en faible quantité par le parasite. Comme *P. carinii* semble capable d'incorporer des lipides complexes provenant de l'hôte et de les utiliser directement, la synthèse de faibles quantités de cet acide gras indiquerait qu'il joue un rôle métabolique essentiel et qu'il ne se trouve pas chez l'hôte. Il serait donc une cible métabolique potentielle (Ellis et coll., 1994).

Le groupe de Kaneshiro a abordé le métabolisme des isoprénoïdes. Chez les eucaryotes, une même voie métabolique conduit à la synthèse de ces composés qui comprennent des molécules aussi importantes que les dolichols, les ubiquinones (CoQ) et les stérols. Un composé intermédiaire essentiel de cette voie est l'acide mévalonique. Cet acide est incorporé par le parasite et utilisé pour la synthèse de CoQ. Les quantités de CoQ chez *Pneumocystis* sont basses; cela suggère que son métabolisme énergétique n'est pas strictement aérobie (Guo et Kaneshiro, 1995). De plus, il est intéressant de constater qu'on retrouve chez le parasite surtout du CoQ₁₀, tandis que dans le poumon du rat, on retrouve CoQ₉ et CoQ₈ (Kaneshiro et coll., 1994). L'anneau benzoquinone du CoQ est synthétisé chez *Pneumocystis* à partir d'acides aminés aromatiques dont les gènes codant les enzymes qui les synthétisent ont été caractérisés (Banerji et coll., 1993). Cette voie métabolique (voie du shikimate) n'existe pas chez les mammifères elle constitue donc une autre cible parasitaire potentielle.

Quant aux stérols, il a été montré que le stérol dominant chez *Pneumocystis* est le cholestérol, qui serait obtenu par le parasite directement à partir du poumon de l'hôte. Mais *Pneumocystis* a aussi des C₂₈ et C₂₉ stérols, qui sont faiblement représentés dans les extraits. Absents dans le poumon de l'hôte, ils seraient synthétisés par le parasite. Ils pourraient jouer un rôle métabolique critique et représenter aussi des cibles potentielles (Kaneshiro et coll., 1994).

La synthèse des b-1,3 glucanes pariétaux constituerait une autre cible métabolique chez *Pneumocystis* dans la mesure où des inhibiteurs de leur synthèse comme les échinocandines et papulocandines, agissent sur le parasite (Schmatz et coll., 1990). Enfin, de rares études sur les mécanismes dont dispose le parasite pour lutter contre le stress oxydatif ont été faites. Pesanti (1984) a signalé la présence de superoxyde dismutase, catalase et glucose-6-phosphate déshydrogénase chez *Pneumocystis*. Des travaux non publiés de Denis et coll. semblent confirmer la présence d'au moins une superoxyde dismutase chez *Pneumocystis*. Si elle était dépendante du fer, elle constituerait également une cible potentielle. D'autres observations suggèrent la présence d'une activité oxydasique importante à la surface parasitaire. Il est probable que l'habitat de *Pneumocystis*, l'alvéole pulmonaire, soit riche en radicaux libres provenant de l'air respiré mais aussi des macrophages alvéolaires activés. Les mécanismes métaboliques antioxydants de *Pneumocystis* peuvent sans doute représenter des cibles thérapeutiques potentielles.

Toxoplasmose

Des progrès ont été effectués dans l'utilisation de modèles animaux pour tester l'activité de drogues anti-Toxoplasma. Des modèles animaux de co-infection, toxoplasmose/pneumocystose, toxoplasmose/mycobactériose, souris MAIDS (Murine Acquired Immuno Deficiency Syndrome) commencent à être utilisés (Brun-Pascaud et coll., 1994). L'étude de la charge parasitaire par organe s'avère plus intéressante que la simple survie des animaux traités par rapport aux témoins (Piketty et coll., 1990). Ces méthodes ont permis de mettre en évidence une activité certaine de l'azithromycine (Derouin et coll., 1992) et de l'atovaquone contre *Toxoplasma* (Romand et coll., 1993). Cependant, cette dernière molécule se révèle parfois décevante et ne permet pas de prévenir les récurrences. De plus, l'association avec d'autres molécules (pyriméthamine, sulfadiazine, clarithromycine ou minocycline) ne potentialise pas son action (Romand et coll., 1993). Par contre il existe une synergie entre clarithromycine et minocycline (Derouin et coll., 1992). Plus récemment, il a été expérimentalement montré que la rifabutine, un dérivé semi-synthétique de la rifamycine, a une action contre *Toxoplasma* qui est potentialisée par son association avec d'autres molécules actives contre le parasite (pyriméthamine, clindamycine, atovaquone) (Araujo et coll., 1994).

La clindamycine et autres macrolides ont un effet léthal retardé sur *Toxoplasma* (Cleveland's Workshop on Opportunistic Protists, June 1994). Une exposition initiale du parasite *in vitro* à ces drogues pendant plus de 25 heures induit

- un doublement du temps du développement intracellulaire du premier cycle après traitement;
- la mort du parasite après l'invasion suivante. Des données récentes suggèrent que clindamycine et azithromycine inhibent la synthèse protéique de *Toxoplasma*. Comme cette action n'est pas exercée sur la synthèse protéique cytoplasmique ni mitochondriale, il a été suggéré que la clindamycine et l'azithromycine agiraient sur un organelle de type plaste, une seconde localisation d'ADN extra-chromosomique capable de conduire sa propre synthèse protéique. Cette hypothèse permet d'envisager un ancêtre végétal pour les *Apicomplexa* et ouvrirait de nouvelles voies dans la recherche de nouvelles molécules actives contre cet important groupe de protozoaires (Wilson et coll., 1994; Derouin, 1995).

L'exploration de la différenciation bradyzoïte-tachyzoïte nécessite le développement de marqueurs spécifiques. Quelques-uns sont actuellement disponibles (Soete et coll., 1994) et ils ont permis de montrer la co-existence de tachyzoïtes et de bradyzoïtes dans le cerveau d'hôtes immunodéprimés présentant une toxoplasmose cérébrale (Odaert, 1993). Elle nécessite aussi le développement de modèles. Dans ce domaine il est actuellement possible d'induire in vitro la différenciation tachyzoïte-bradyzoïte en augmentant le pH du milieu, la température ou en ajoutant de l'arsénite de sodium (Soete et coll., 1994). In vitro, le monoxyde d'azote (NO) induit la formation de bradyzoïtes, via la modification de la chaîne respiratoire mitochondriale du parasite (Bohne et coll., 1994). L'interféron-7 induit aussi l'enkystement, mais par l'intermédiaire de la stimulation de cellules immunocompétentes qui produisent du NO quand elles sont activées par cette cytokine (Suzuki et coll., 1989). Quant à la compréhension du mécanisme intime de la différenciation tachyzoïte-bradyzoïte, elle pourrait être abordée en utilisant des méthodes de transfection, possibles depuis peu chez *Toxoplasma* (Soldati et Boothroyd, 1993).

Cryptosporidiose

Des études récentes sur la sinefungine, un antibiotique produit par une espèce du genre *Penicillium*, sont assez encourageantes et mériteraient d'être approfondies. En effet, cette molécule s'est avérée significativement active sur *Cryptosporidium* chez le rat immunodéprimé (Lemeteil et coll., 1993) et agirait in vitro sur la phase sexuée de son cycle (Favennec et coll., 1994).

L'exploration de nouvelles pistes consiste, dans le cas de la cryptosporidiose, à développer des modèles reproductibles in vivo et in vitro, à mieux comprendre l'activité des rares molécules qui exercent un certain effet, comme la sinefungine, et à rechercher des nouveaux principes actifs.

Les relations phylogénétiques qui ont été établies entre *Cryptosporidium* et d'autres organismes, à partir des alignements de séquences du gène de la β -tubuline, le séparent des autres *Apicomplexa*, le rapprochant d'autres organismes - plantes, algues, ciliés et *Kinetoplastida* - et suggèrent que *Cryptosporidium* pourrait être sensible à des molécules anti-tubuline (Edlind et coll., 1994). Les benzimidazoles ne semblent pas actifs mais d'autres molécules anti-tubuline (dinitroanilines ?) pourraient l'être.

Isosporose

Isospora belli est une coccidie exclusivement humaine, non cultivable. De plus, nous ne disposons pas de modèles animaux d'isosporose. À l'heure actuelle, la recherche thérapeutique dépend essentiellement du raisonnement analogique, puisqu'il existe de nombreuses coccidies animales monoxènes. L'anticoccidien diclazuril agirait sur *I. belli*.

Microsporidiose

La détection de microsporidies dans les selles, dans les urines, dans d'autres fluides biologiques ou dans les tissus nécessite des efforts soit dans la mise au point ou l'amélioration des réactifs utilisés en microscopie -colorants cytologiques, histologiques, anticorps monoclonaux, sondes nucléiques pour hybridation in situ, soit dans le développement d'autres méthodes – PCR-hybridation, antigènes solubles. L'identification certaine des espèces nécessite l'utilisation de la microscopie électronique à transmission. Des méthodes de détection fiables et reproductibles sont nécessaires, non seulement pour le diagnostic, mais aussi pour la surveillance post-thérapeutique.

En ce qui concerne le traitement de ces affections, il faut signaler que les anti-parasitaires disponibles s'avèrent inactifs ou insuffisants. Un benzimidazole, l'albendazole, a une certaine action sur *S. intestinalis* et *Enc. hellem* mais il est très faiblement actif contre *Ent. bienewisi*, l'espèce la plus fréquente. La fumagilline s'avère efficace en traitement local.

L'exploration de l'activité des molécules anti-tubuline sur les microsporidies est justifiée. Des efforts seront donc nécessaires pour développer des modèles expérimentaux. L'espèce la plus fréquemment observée chez les patients atteints de sida avéré, *Ent. bienewisi*, n'est pas cultivable et ne se développe pas chez l'animal. *S. intestinalis* pourrait être mis en culture tandis que *Enc. hellem* et *Enc. cuniculi* le sont déjà mais des modèles animaux existent que pour cette dernière espèce.

Candidose et mycoses profondes

La candidose muqueuse des patients atteints de sida avéré pose deux types de problèmes. D'une part, les conditionnements disponibles des antifongiques actifs ne sont pas adaptés à une administration locale efficace et confortable. D'autre part, vu le faible nombre d'antifongiques efficaces, de nouveaux principes actifs ou de nouvelles stratégies de prévention ou de traitement seraient souhaitables. Dans ce sens, le phénomène *Ciller*, analysé à propos de *Pneumocystis*, constitue une perspective intéressante et originale.

Contre la cryptococcose et autres mycoses viscérales, il existe des anti-fongiques efficaces utilisables par voie parentérale amphotéricine-B, 5-fluorocytosine, kétoconazole, fluconazole, itraconazole. Des efforts sont faits actuellement pour améliorer l'efficacité et diminuer la toxicité de l'amphotéricine-B, comme des préparations émulsifiées ou l'amphotéricine-B liposomale. Les imidazolés posent parfois des problèmes de toxicité et/ou de pharmacocinétique au niveau de l'absorption digestive et du passage de la barrière hémato-encéphalique. Le phénomène *killer*, évoqué plus haut, constitue ici aussi une perspective intéressante à explorer.

Antibiotiques

Il existe chez les vertébrés un réseau complexe de défense chimique contre les micro-organismes, réseau qui co-existe avec le système immunitaire classique. Cette défense chimique fait appel à un répertoire étendu de petits peptides antibiotiques à large spectre d'activité, produits aussi bien par les macrophages que par des cellules non myéloïdes comme celles de la peau ou de l'épithélium intestinal ou respiratoire. L'analyse des composants et des modes d'action de ce système de lutte chimique ouvre la voie à de nouvelles pistes thérapeutiques. Les défensines, les bactériosines et les dermaseptines sont les représentantes de cette famille. Les dermaseptines isolées de la peau de grenouille se sont révélées actives contre certains champignons et protozoaires flagellés. De nombreuses autres sources sont explorées, comme les insectes qui, représentant une classe extrêmement diversifiée, pourraient constituer un réservoir important de molécules à activité antibiotique.

Stratégies de recherche transversale

De nombreuses maladies infectieuses sont causées par des bactéries ou des protozoaires, certains passant une partie de leur vie à l'intérieur des

cellules de l'organisme infecté. Cette mise à l'abri du système immunitaire a pour contrepartie la nécessité de pouvoir s'y multiplier, ce qui exige une biosynthèse de nouvelles membranes. Un moyen pour exterminer ces agents infectieux est donc d'empêcher le parasite intra- ou extra-cellulaire de synthétiser ses membranes.

Ainsi, une étude approfondie du métabolisme phospholipidique de *Plasmodium falciparum* - voies métaboliques, accès des précurseurs, dynamique intracellulaire - a permis d'élaborer une pharmacologie d'interférence. Ce parasite possède des voies métaboliques propres à la fois aux procaryotes et aux eucaryotes. Actuellement, un modèle pharmacologique via des effecteurs du transport de la choline de l'érythrocyte infecté est en développement (Vial, 1990). La synthèse de nouveaux produits - plus de 350 - a conduit à des produits pilotes montrant une activité antipaludéenne puissante.

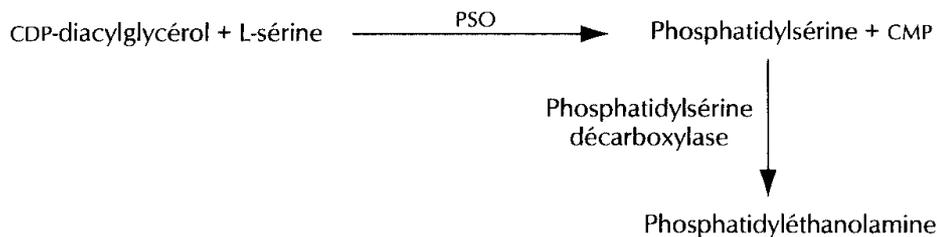
Les voies de biosynthèse et de dégradation des phospholipides sont bien conservées pour une grande variété d'organismes, des levures aux mammifères. Le modèle de levure mutée et les techniques de complémentation de gènes ont permis d'isoler les gènes et les ADNC impliqués dans les différentes voies biosynthétiques (Raetz, 1986; Carman et Henry, 1989; Nikoloff et Henry, 1991, Paltauf et coll., 1992). Des informations sur la séquence et les systèmes de régulation existent maintenant pour de nombreuses autres enzymes de synthèse des phospholipides.

Pharmacomodulation du métabolisme de la phosphatidylsérine

Les voies majeures de biosynthèse des phospholipides présentes chez les eucaryotes inférieurs sont également retrouvées dans les cellules de mammifères, à l'exception de l'activité sérine décarboxylase et de la voie de biosynthèse de la phosphatidylsérine via la phosphatidylsérine synthétase. Les stratégies d'intervention pharmacologique dans ce domaine, inexistantes actuellement, auraient des retombées potentiellement majeures contre les bactéries, les champignons et les parasites.

Dans les bactéries et les levures, la phosphatidylsérine est synthétisée par réaction entre la L-sérine et le CDP-diacylglycérol (CDP-DAG), grâce à une enzyme membranaire, la CDP-DAG - phosphatidyl transférase (ou phosphatidyl synthétase, EC 2.7.8.8, appelé PSO ci-après). La biosynthèse *de novo* de la phosphatidyléthanolamine se fait alors essentiellement par la décarboxylation de la phosphatidylsérine par la phosphatidylsérine décarboxylase (EC 4.1.1.65)(Steiner et Lester, 1972).

Chez les mammifères, la PSO n'étant pas présente, la phosphatidylsérine est synthétisée par une réaction d'échange de base entre la L-sérine libre et la tête polaire d'un phospholipide préexistant. Cette réaction est catalysée par au moins deux sortes d'enzymes appelées phosphatidylsérine



synthétases I et II. La phosphatidylsérine synthétase I peut utiliser la phosphatidylcholine comme donneur du groupement phosphatidyl et peut également catalyser l'incorporation de choline et d'éthanolamine dans la phosphatidylcholine et la phosphatidyléthanolamine, respectivement. La phosphatidylsérine synthétase II ne peut utiliser que la phosphatidyléthanolamine comme donneur, et ne peut incorporer la choline.

Ces réactions d'échange de bases sont généralement indépendantes de l'énergie et nécessitent des ions Ca^{2+} . La phosphatidylcholine, la phosphatidylsérine et la phosphatidyléthanolamine, sous les formes diacyl, alkyl ou alkényléther, peuvent servir de substrats (Bell et Coleman, 1980; Bjerve, 1985; Kuge et coll., 1985). Néanmoins, il est important de noter que des synthèses de phosphatidylsérine, n'empruntant aucune des voies connues à ce jour, c'est-à-dire ATP-dépendantes, stimulées par le CMP ou CDP-diacylglycérol indépendantes, ont récemment été observées dans des cellules eucaryotes (Baranska, 1980; Pullarkat et coll., 1981).

Enzymes de défense antioxydantes

Le système vivant doit se défendre contre les espèces activées de l'oxygène, d'origine endogène ou exogène, et dispose pour cela de dispositifs enzymatiques - superoxyde dismutase, glutathion peroxydase et enzymes de régénération du glutathion réduit, catalase - ou non enzymatiques - piègeurs de radicaux. Les organismes pathogènes, n'échappent pas à cette règle, mais sont soumis en plus aux réactions spécifiques de l'hôte qu'ils attaquent - immunité cellulaire non spécifique - qui contribuent à les éliminer. Certaines des enzymes de défense de ces organismes pathogènes peuvent constituer des cibles intéressantes pour le développement de nouveaux médicaments, à condition qu'elles soient suffisamment distinctes de celles de l'homme pour pouvoir être visées sélectivement.

La superoxyde dismutase (SOD) constitue l'une des enzymes présentant un intérêt possible pour un ciblage spécifique. Chez de nombreux microorganismes pathogènes - bactéries, protozoaires -, le métal cofacteur de cette enzyme - le fer - est différent de celui des enzymes de l'homme - cuivre/zinc ou manganèse. Cette différence est associée à des particularités de la séquence peptidique

et de la structure, qui rendent les SOD à fer spécifiquement sensibles au peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Un ciblage chimique orienté spécifiquement sur les structures en relation avec la sensibilité de ces enzymes vis-à-vis de H₂O₂ permettrait de les inhiber sélectivement.

Pour estimer de façon réaliste la pertinence de ce ciblage, il importe de connaître à la fois les structures des SOD considérées, mais aussi le rôle précis joué par ces enzymes dans la protection des organismes contre le choc oxydant. L'analyse des 65 séquences complètes de SOD-Fe et-Mn connues montre qu'il existe en réalité quatre familles distinctes d'enzymes dont la divergence phylogénétique est lointaine; ces SOD apparaissent comme de bonnes horloges moléculaires pour l'étude de l'évolution.

Hormis celle d'*Echerichia coli*, le mécanisme de régulation de la SOD à fer et son rôle dans la réponse au choc oxydant reste mal connu. Quelques résultats ont été obtenus avec *Entamoeba histolytica* où l'intervention d'une iron-box connue chez *E. colt* a pu être avancée. Chez *P. falciparum*, la présence d'une séquence proche de celle spécifique de l'iron-box a pu être montrée sur le plan génomique.

Plusieurs SOD à fer ont pu être cristallisées et leur structure déterminée par diffraction des rayons X. Les travaux montrent une grande similitude de structure au niveau du site actif entre les SOD à fer et les SOD à manganèse, mais ne rendent pas compte de la sensibilité sélective des SOD à fer à l'action de H₂O₂. Toutefois, d'autres études montrent que cette sensibilité semble due à la position particulière de résidus tryptophane présents dans les SOD à fer et absents de la structure des SOD à manganèse.

Parmi les SOD à fer, certaines appartiennent à des organismes ayant un rôle pathogène important et/ou pour lesquels la chimiothérapie rencontre des difficultés chez les protozoaires, *Plasmodium falciparum*, *Leishmania donovani*, *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis*; chez les bactéries, *Helicobacter* et *Campylobacter*, *Coxiella* et divers organismes anaérobies. Un ciblage de l'enzyme aboutissant à de nouvelles possibilités thérapeutiques pourrait être intéressant.

Quelles études envisager pour tester la fiabilité de cette piste de recherche ?

Le développement de molécules pilotes peut se réaliser par deux voies différentes

- Le criblage d'un grand nombre de molécules disponibles dans des banques chimiques, grâce à un test miniaturisé et automatisé de mesure de l'activité SOD. Ce test pourrait utiliser une SOD à fer du commerce, ou une SOD recombinante d'un organisme pathogène important, comme *Plasmodium falciparum*. Il est possible de miniaturiser un test de criblage, obligatoirement peu sensible, mais bien adapté pour tester de nombreuses molécules.

- En se fondant sur la structure de la protéine déterminée à partir de la diffraction aux rayons x ou de la RMN à haute énergie, à l'aide de programmes appropriés, il est possible de rechercher, dans des banques de structures chimiques, les molécules les plus aptes à bloquer sélectivement l'enzyme. La connaissance de la structure de la SOD à manganèse permettra de contrôler le risque de réaction croisée sur l'enzyme humaine.

Ces deux approches devraient permettre de trouver des molécules inhibitrices pilotes dont il conviendrait de vérifier l'activité anti-infectieuse. Ces molécules pourraient être ensuite améliorées par modélisation moléculaire.

L'une des objections qui peut être soulevée est le risque de mutation du gène, qui peut aboutir à une protéine insensible à la drogue. Cet écueil est prévisible lors des tests systématiques la mutagenèse dirigée effectuée sur les gènes clonés permet de produire des protéines mutées sur les résidus visés par le ciblage médicamenteux et la sensibilité aux molécules pourra donc être testée en parallèle avec la protéine originale. Il sera possible également de vérifier si une protéine mutée et éventuellement résistante garde l'intégrité de ses propriétés enzymatiques.

Les interfaces possibles avec l'industrie se situent surtout, dans un premier temps, dans les banques de produits chimiques qui peuvent fournir les premières molécules candidates.

Des recherches très importantes ont été effectuées ces dernières années dans l'approche thérapeutique des lésions radicalaires utilisant des SOD ou des molécules mimant leur activité. Certaines de ces molécules pourraient constituer des modèles de base intéressants pour rechercher des inhibiteurs spécifiques.

BIBLIOGRAPHIE

- ALIOUAT EM, CAILLEZ JC, SEGUY N, DEI-CAS E, POLONELLI L, GERLONI M, CONTI S, CAMUS D. Inhibitory effect of yeast killer toxin to the in vitro pneumocystis carinii attachment. *Serodiagn Immunother Infect Dis* 1993, 5: 102-106
- AMICHE M, DUCANCEL F, MOR A, BOULAIN JC, MENEZ A, NICOLAS P. Precursors of vertebrate peptide antibiotics dermaseptin b and adenoregulin have extensive sequence identities with precursors of opioid peptides dermorphin, dermenkephalin, and del torphins. *J Biol Chem* 1994, 269: 17847-17852
- ARAUJO FG, SLIFER T, REMINGTON JS. Rifabutin is active in murine models of toxoplasmosis. *Antimicrob Agents Chemother* 1994, 38: 570-575
- BANERJI S, LUGLI EB, WAKEFIELD AE. Identification of two genetically distinct strains of *Pneumocystis carinii* in infected ferret lungs. *J Euk Microbiol* 1994, 41: S73
- BANERJI, S, WAKEFIELD AE, ALLEN AG, MASKELL DJ, PETERS SE, HOPKIN JM. The cloning and characterization of the *arom* gene of *pneumocystis carinii*. *J Gen Microbiol* 1993 139: 2901-2914

- BARANSKA J. Phosphatidylserine biosynthesis in mitochondria from Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim Biophys Acta* 1980, 619: 258-266
- BECUWE P. SLOMIANNY C, CAMUS D, DIVE D. Presence of an endogenous superoxide dismutase activity in three rodent malaria species. *Parasitol Res* 1993, 79: 349-352
- BELL RM, COUEMAN RA. Enzyme asymetry in hepatic microsomal vesicles. Criteria for localization of luminal enzymes with proteases. *Ann Rev Biochem* 1980, 59: 184-188
- BJERVE KS. The biosynthesis of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine from L3-14C serine in isolated rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 1985, 833: 396-405
- BOHNE W. HEESEMANN J. GROSS U. Reduced replication of *Toxoplasma gondii* is necessary for induction of bradyzoite specific antigen: a possible role for Nitric oxide triggering stage conversion. *Infect Immun* 1994, 62: 1781-1787
- BRUN-PASCAUD M, CHAU F. SIMONPOU AM, GIRARD PM, DEROUIN F. POCIDALO JJ. Experimental evaluation of combined prophylaxis against murine pneumocystosis and toxoplasmosis. *J Infect Dis* 1994, 170: 653-658
- BULET P. COCIANCICH S. DIMARCQ JL, LAMBERT J. REICHART JM, HOFFMANN D, HETRU C, HOFFMANN JA. Isolation from a coleopteran insect of a novel inducible antibacterial peptide and a new members of the insect defensin family. *J Biol Chem* 1991, 266: 24520-24525
- BULET P. COCIANCICH S. REULAND M, SAUBER F. BISCHOFF R. HEGY G. VAN DORSSELAER A, HETRU C, HOFFMANN JA. A novel insect defensin mediates the inducible antibacterial activity in larvae of the dragonfly *aeschna* (paleoptera, odonata). *Eur J Biochem* 1992, 209: 977-984
- CAILUEZ JC, SÉGUY N. AUOUAT EM, POLONELU L, CAMUS D, DEI-CAS E. A yeast killer toxin against *Pneumocystis carinii*: a hypothetical way to control pneumocystosis. *Medical Hypotheses* 1994, 43: 167-171
- CARMAN GM, HENRY SA. Phospholipid in yeast. *Ann Rev Biochem* 1989, 58: 635-669
- CHALK R. TOWNSON H. NATORI S. DESMOND H. HAM PJ. Purification of an insect defensin from the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* 1994, 24: 403-410
- CHUNG V, WAKEFIELD AE, KINSMAN OS, JACKSON HC. DNA amplification of a portion of the phosphomannose isomerase (PMI) gene in *Pneumocystis carinii*-enriched extracts. *J Euk Microbiol* 1994, 41: S82-S83
- COCIACICH S. BULET P. HETRU C, HOFFMANN JA. The inductible antibacterial peptides of insects. *Parasitology Today* 1994, 10: 132-139
- COCIANCICH S. DUPONT A, HEGY G. LANOT R. HOLDER F. HETRU C, HOFFMANN JA, BULET P. Novel inductible antibacterial peptides from a hemipteran insect, the sapsucking bug *pyrrhacoris apterus*. *Biochem J* 1994, 300: 567-575
- DEROUIN F. Les nouveaux pathogènes et le mode d'action de l'azithromycine: *Toxoplasma gondii*. *Pathol Biol (Symposium Az.ithromycine)* 1992,

- DEROUIN F, ALMADANY R, CHAU F, ROUVEIX B, POCIDALO JJ. Synergistic activity of azythromycine and pyrimethamine or sulfadiazine in acute experimental toxoplasmosis. *Antimicrob Agents Chemother* 1992, 36: 997-1001
- 157
- DEROUIN F, CAROFF B, CHAU F, PROKOCIMER P, POCIDALO n Synergistic activity of clarithromycine and minocycline in an animal model of acute experimental toxoplasmosis. *Antimicrob Agents Chemother* 1992, 36: 2852-2855
- DESSEN A, QUEMARD A, BLANCHARD JS, JACOBS WR, SACCHETTINI JC. Crystal structure and function of the isoniazid target of mycobacterium tuberculosis. *Science* 1995, 267: 1638-1641
- DIMARCQ JL, HOFFMANN D, MEISTER M, BULET P, LANOT R, REICHAERT JM, HOFFMANN JA. Characterization and transcriptional profiles of a Drosophila gene encoding an insect defensin. A study in insect immunity. *Eur J Biochem* 1994, 221: 201-209
- DOUGLAS KT. Rational drug design in parasitology. *Parasitology Today* 1994,10: 389-392
- EDUND T, VISVESVARA G, LI J, KATIYAR S. Cryptosporidium and microsporidial β -tubulin sequences: productions of benzimidazole sensitivity and phylogeny. *J Euk Microbiol* 1994, 41: 38S
- ELLIS JE, REILLY MH, KANESHIRO ES. Identification of an epoxy fatty acid in *Pneumocystis carinii* lipids. *J Euk Microbiol* 1994, 41: 87S
- EVANS TG, RASMUSSEN K, WIEBKE G, HIBBS JB JR. Nitric oxide synthesis in patients with advanced HIV infection. *Clin Exp Immunol* 1994, 97: 83-86
- FAVANNEC L, EGRAZ-BERNARD M, COMBY E, LEMETEIL D, BALLESTIN BRASSEUR P. Immunofluorescence detection of *Cryptosporidium parvum* in Caco-2 cells: a new screening method for anticryptosporidial agents. *J Euk Microbiol* 1994, 41: 39S
- GANZ T, LEHRER RI. Defensins. *Curr Opin Immunol* 1994, 6: 584-589
- GOHEEN MP, BARTLETT MS, CURRENT WL, SHAW MM, SMITH JW. Immunoelectron microscopy of *Pneumocystis carinii* exposed to a β -1-3 glucan synthase inhibitor LY 302146. *J Euk Microbiol* 1994, 41: 89S
- GUO ZK, KANESHIRO ES. Phospholipid composition of *Pneumocystis carinii* and effects of methylprednisolone immunosuppression on rat lung lipids. *Infect and Immun* 1995, 63: 1286-1290
- HUND W, HOFFMANN H. In vitro susceptibility and sterol biosynthesis of *Candida albicans* strains after long-term treatment with azoles in HIV-infected patients. *Infection* 1994, 22: 124-131
- KANESHIRO ES, EUNS JE, ZHOU LH, RUDNEY H, GUPTA A, JAYASIMHULU K, SETCHELL KDR, BEACH DH. Isoprenoid metabolism in *Pneumocystis carinii*. *J Euk Microbiol* 1994,41: 93
- KODAKI T, NIKAWA J, HOSAKA K, YAMASHITA S. Functional analysis of the regulatory region of the yeast phosphatidylserine synthase gene, PSS. *J Bacteriol* 1991,173: 7992-7995
- KUGE O, NISHIJIMA M, AKAMATSU Y. Isolation of a somatic-cell mutant defective in phosphatidylserine biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci* 1985, 82: 1926-1930

KUGE O, NISHIJIMA M, AKAMATSU Y. A chinese hamster cDNA encoding a protein essential for phosphatidylserine synthase I activity. *J Biol Chem* 1991,266: 24184-24189S

LEAKE HA, APPELYARD MN, HARTUEY JP. Successful treatment of resistant cryptococcal meningitis with amphotericin B lipid emulsion after nephrotoxicity with conventional intravenous amphotericin B. *J Infect* 1994, 28: 319-322

LEMETEIL D, ROUSSEL F. FAVENNEC L, BALLETT JJ, BRASSEUR P. Assessment of candidate anti-cryptosporidial agents in an immunosuppressed rat model. *J Infect Dis* 1993, 167: 766-768

MOR A, AMICHE M, NICOLAS P. Structure, synthesis and activity of dermaseptin b. a novel vertebrate defensive peptide from frog skin: relationship with adenoregulin. *Biochem* 1994, 33: 6642-6650

MOR A, HANI K. NICOLAS P. The vertetrate peptide antibiotics dermaseptins have over-lapping structural features but target specific microorganisms. *J Biol Chem* 1994,269: 31635-31641

MOR A, NICOLAS P. Isolation and structure of novel defensive peptides from frog skin. *Eur J Biochem* 1994, 219: 145-154

MOR A, NICOLAS P. The NH₂-terminal α -helical domain 1-18 of dermaseptin is responsible for antimicrobial activity. *J Biol Chem* 1994, 269: 1934-1939

NICOLAS P. DELFOUR A. Les peptides de la défense chimique des vertébrés. *Path Biol* 1994, 42: 287-291

NIKOLOFF M, HENRY S. Genetic analysis of yeast phospholipid biosynthesis. *Ann Rev Genet* 1991, 25: 559-583

NOUSTADT KH, POWLES MA, FUJIOKA H. AIKAWA M, SCHMATZ DM. Use of beta-1,3-glucan-specific antibody to study the cyst wall of *Pneumocystis carinii* and effects of pneumocandin BO analog L-733, 560. *Antimicrob Agents Chemother* 1994, 38: 2258-2265

ODAERT H. Toxoplasmose cérébrale murine: étude de l'interconversion bradyzoite - tachyzoïte lors de l'infection et de la réactivation. Mémoire DES Biologie Médicale, Université de Lille II 1993

PALLUAULT F. SLOMMIANNY C, DEI-CAS E. SOULEZ B. CAMUS D. High osmotic pressure enables fine ultrastructural and cytochemical studies on *Pneumocystis carinii*. I. Epon embedding. *Parasitol Res* 1992, 78: 437-444

PALTAUF P. KOHLWEIN SD, HENRY SA. Regulation and compartmentalization of lipid synthesis in yeast. In *The molecular and cellular biology of the yeast saccharomyces: gene expression*. Cold Spring Harbor. 1992

PIKETTY C, DEROUIN F. ROUVEIX B. POCIDALO JJ . In vivo assessment of antimicrobial agents against *Toxoplasma gondii* by quantification of parasites in the blood, lungs, and brain of infected mice. *Antimicrob Agents Chemother* 1990, 34: 1467-1472

POLONELLI L, DE BERNARDIS F. CONTI S. BOCCANERA M, GERLONT M, MORACE G. MAGUANI W. CHEZZI C, CASSONE C. Idiotypic intravaginal vaccination to protect against candidal vaginitis by secretory, yeast killer toxin-Uke anti-idiotypic antibodies. *J Immunol* 1994, 152: 3175-3182

- POLONELLI L, F LORENZINI F, DE BERNARDIS M, GERLONI S, CONTI G, MORACE W, MAGUANI M, CHEZZI F. Idiotypic vaccination: immunoprotection mediated by anti-idiotypic antibodies with antibiotic activity. *Scand J Immunol* 1993, 37: 105-110
- POLONNELLI L, MORACE G, CONTI S, GERLONI M, MENOZZI MG, CAILLIEZ JC. Conceptions et perspectives du phénomène " killer " chez les levures. *J Mycol Méd* 1991, 1: 284-295
- PULLARKAT RK, SBASCHNIG M, RCHA H. Biosynthesis of phosphatidylserine in rat brain microsomes. *Biochim Biophys Acta* 1981, 664: 117-123
- RAETZ CR. Enzymology, genetics and regulation of membrane phospholipid synthesis in *E. Coli*. *Microbiol Rev* 1978, 42: 614-659
- RAETZ CR. Molecular genetics of membrane phospholipid synthesis. *Ann Rev Gen* 1986, 20: 253-295
- ROMAND S, PUDNEY M, DEROUIN F. In vitro and in vivo activities of the hydroxynaphtho" quinone Atovaquone alone or combined with pyrimethamine, sulfadiazine, clarithromycin, or minocycline against *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993, 37: 2371-2378
- SCHLUGER NW, KINNEY D, HARKIN TJ, ROM WN. Clinical utility of the polymerase chain reaction in the diagnosis of infections due to *Mycobacterium tuberculosis*. *Chest* 1994, 105: 1116-1121
- SCHMATZ D, ROMANCHECK M, PITTARELU L, SCHWARTZ R, FROMTUNG R, NOUSTADT K, VANMIDDLESWORTH F, WILSON K, TURNER M. Treatment of *Pneumocystis carinii* with 1,3- β glucan synthesis inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87: 5950-5954
- SCHONWETTER BS, STOLZENBERG AD, ZASLOFF MA. Epithelial antibiotics induced at sites of inflammation. *Science* 1995, 267: 1645-1648
- SÉGUY N, AUOUAT EM, DEI CAS E, POLONELLI L, CAMUS D, CAILLIEZ JC. Susceptibility of *Pneumocystis carinii* to a *Pichia anomala* killer toxin. *J Euk Microbiol* 1994, 41: 109S
- SÉGUY N, CAILLIEZ JC, POLONELLI L, CAMUS D, DEI-CAS E. Inhibitory effect of a *Pichia ano"* mala killer toxin on the *Pneumocystis* infectivity to the SCID mouse. *Parasitol Res* 1996, sous presse
- SLEIGHT RG, MEHTA MA, KANESHIRO ES. Uptake and metabolism of fluorescent lipid analogs by *Pneumocystis carinii*. *J Euk Microbiol* 1994, 41: 111S
- SOETE M, CAMUS D, DUBREMETZ JF. Experimental induction of bradyzoite specific antigen expression and cyst formation by the RH strain of *Toxoplasma gondii* in vitro. *Exp Parasitol* 1994, 78: 361-370
- SOLDATI D, BOOTHROYD JC. Transient transfection and expression in the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *Science* 1993, 260: 349-352
- SPERKA-GOTTLIEB C, FASCH B, KUCHLER K, BAILIS A, HENRY S, PALTAUF F, KOHLWEIN S. The hydrophilic and acidic N-terminus of the integral membrane enzyme phosphatidylserine synthase is required for efficient membrane insertion. *Yeast* 1990, 6: 331-343
- STEINER MR, LESTER RL. In vitro studies of phospholipid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1972, 260: 222-243

- STRAHILEVITZ J, MOR A, NICOLAS P, SHAI Y. Spectrum of antimicrobial activity and assembly of dermaseptin-b and its precursor form in phospholipid membranes. *Biochemistry* 1994, 33: 1051-10960
- SUZUKI Y, CONLEY FK, REMINGTON JS. Importance of endogenous IFN-gamma for prevention of toxoplasmic encephalitis in mice. *J Immunol* 1989, 143: 2045-2050
- TRINEL PA, BORG VON ZEPEUN M, LEPAGE G, JOUAULT T, MACKENZIE D, POULAIN D. Isolation and preliminary characterization of the 14- to 18-kilodalton *Candida albicans* antigen as a phospholipomannan containing beta-1,2-linked oligomannosides. *Infect Immun* 1993, 61: 4398-4405
- VIA L HJ, ANCEUN ML, PHILIPPOT JR, THUET MJ. Biosynthesis and dynamics of lipids in Plasmodium-infected mature mammalian erythrocytes. *Blood Cells* 1990, 16: 531-555
- WAKEFIEUD AE. Detection of DNA sequences identical to *Pneumocystis carinii* in samples of ambient air. *J Eut Microbiol* 1994, 41: S116
- WILSON RJM, WILUAMSON DH, PREISER P. Malaria and other Apicomplexans: the "Plant" connection. *Infections Agents and Disease* 1994, 3: 29-37
- ZHANG Y. Genetic basis of isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Res Microbiol* 1993, 144: 143-149