

Paludisme : de la génétique et de la biologie moléculaire au contrôle de la maladie

par Pierre Ambroise-Thomas

Interactions Cellulaires Parasite-Hôte, Faculté de Médecine, Université Joseph Fourier, Grenoble.

E-mail : P.Ambroise-Thomas@chu-grenoble.fr

Reçu le 26 janvier 2004

RÉSUMÉ

Le décryptage des génomes de *Plasmodium falciparum* et de son principal vecteur, *Anopheles gambiae*, constitue une avancée scientifique considérable. Il pourra en résulter des progrès pour la lutte contre le paludisme. Sur le plan thérapeutique, de nouvelles cibles ont été identifiées, particulièrement au niveau de l'apicoplaste ou de l'équipement protéasique de *Plasmodium falciparum*. En matière de vaccin, les gènes responsables du phénomène d'échappement immunologique ont été identifiés, de même que de nouvelles cibles vaccinales. La production, par génie génétique, de protéines plasmodiales vaccinales a été réalisée par transfection d'un protozoaire facilement multiplié au laboratoire. Enfin, les perspectives de vaccins à ADN se précisent, avec la possibilité de réaliser une immunisation simultanée contre les différents stades évolutifs du parasite, et la possibilité

d'augmenter considérablement la réponse immune, en associant un gène codant pour certaines cytokines. Enfin, chez l'anophèle vecteur, on a identifié de nombreux gènes codant pour des substances indispensables à la vie de l'insecte, conditionnant la prise du repas de sang ou pouvant inhiber la multiplication sexuée des *Plasmodium*. L'utilisation d'anophèles génétiquement modifiés pour ne plus avoir d'activité vectorielle est envisageable mais se heurte encore à diverses difficultés. Dans les différents domaines considérés, il sera impossible d'exploiter toutes les voies nouvelles et une sélection très stricte s'impose. En outre, plusieurs années seront indispensables pour les diverses phases du développement industriel, pré-clinique et clinique, avant que nous puissions disposer ainsi de nouveaux antipaludiques, de vaccins ou d'autres moyens préventifs.

SUMMARY Malaria: from genetic and molecular biology to disease control

The knowledge of the genomic structure of *Plasmodium falciparum* and of its main vector, *Anopheles gambiae*, may offer new perspectives for malaria therapy, vaccines or control of mosquito-borne transmission. New targets for future antimalarial drugs were identified, mainly apicoplast (a vestige of a vegetal structure incorporated by the parasite) and several enzymes, particularly proteases. The practical difficulty is now to select a few number of these "promising molecules", probably no more than 3 or 4, for a preclinical and clinical pharmaceutical development. Indeed, several other antimalarial drugs are already under development, and the industrial possibilities for developing new drugs are evidently limited. Many new vaccination targets and antigenic proteins were also identified. According to scientific and industrial limitations, a complete evaluation of these antigens is absolutely necessary to select a few of them for clinical development. For anti-

malarial vaccinations, DNA vaccines may offer the most interesting perspectives, with the possibility of simultaneous immunisation against different *Plasmodium* stages and of an adjuvant effect by adding a gene encoding certain cytokines. In *Anopheles gambiae* genome, several genes encoding key-proteins (particularly odorant receptors necessary for blood feeding) were identified, as other genes encoding for proteins limiting the sexual development of *Plasmodium* inside its vector. From a theoretical viewpoint, genetically modified non biting or non transmitting mosquitoes offer new perspectives for the control of malaria transmission, but until now, the preliminary practical attempts gave rather poor results. On the whole, the genomic and proteomic of *Plasmodium falciparum* and *Anopheles gambiae* yielded exciting scientific results, but it is still too early and very speculative to imagine their practical applications for the control of malaria.

Il est parfaitement illusoire de vouloir opposer la recherche fondamentale et la recherche appliquée qui sont évidemment complémentaires. Tenter d'imaginer à

l'avance les applications pratiques de découvertes fondamentales est cependant difficile. Or ce désir d'extrapolation est pourtant bien naturel en médecine, où l'on attend



de la recherche qu'elle apporte des progrès thérapeutiques et prophylactiques. Avec le séquençage des génomes de *Plasmodium falciparum* et de son principal vecteur, *Anopheles gambiae*, nos connaissances fondamentales sur le paludisme ont, en quelques années, fait des progrès considérables, supérieurs sans doute à ce que nous ont appris les trois ou quatre décennies passées. Quelles en seront les applications médicales? C'est ce que nous essayerons d'imaginer, tout en sachant combien de telles prévisions sont inévitablement spéculatives. Nous rappellerons quelques-unes des nouvelles pistes, thérapeutiques, vaccinales ou de contrôles de transmission vectorielle, que l'on doit aux progrès de la génomique, de la protéomique et de la biologie moléculaire. Surtout, nous confronterons ces espoirs aux impératifs pratiques qui conditionnent la mise au point puis le développement de nouveaux médicaments, de vaccins ou d'autres mesures préventives.

NOUVELLES CIBLES THÉRAPEUTIQUES

Par rapport à d'autres classes thérapeutiques, les antipaludiques se heurtent à une contrainte particulière : être actifs contre un eucaryote, le *Plasmodium*, sans être toxiques pour un autre eucaryote, l'Homme, le premier étant situé à l'intérieur des cellules du second. Le problème de base est donc d'identifier des cibles thérapeutiques uniquement présentes chez le parasite.

Apicoplaste

Analogue du chloroplaste chez les végétaux dépourvus de synthèse chlorophyllienne et évidemment absent chez l'Homme, c'est le vestige d'une endosymbiose entre une algue microscopique et les *Plasmodium*. On a identifié à son niveau plus de 450 protéines « probables », pour lesquelles codent environ 10 % des gènes de *Plasmodium falciparum*. En dehors de leur très grand intérêt théorique, il faut souligner que, jusqu'ici, ce sont davantage des cibles de médicaments déjà existants que la source d'antipaludiques nouveaux. Ceci concerne, en particulier, les domaines suivants :

- synthèse des isoprénoides dont l'enzyme clé (la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate (DOXP) réductoisomérase) est absente chez l'Homme mais retrouvée chez des bactéries et dans le plastide de différents végétaux. Chez *Plasmodium falciparum*, cette enzyme est codée par deux gènes différents (DOXP synthase et DOXP réductoisomérase) et elle est notamment inhibée par un herbicide, la fosmidomycine, déjà utilisé comme antibiotique dans le traitement de diverses infections. Comme antipaludique, cet antibiotique a donné des résultats encourageants au cours d'essais cliniques préliminaires. En monothérapie, on observe cependant avec la fosmidomycine de fréquentes recrudescences qui pourraient être évitées par une association à des lincosamides synergiques, comme la lincomycine ou la clindamycine. La bithérapie doit d'ailleurs être la règle avec les inhibiteurs enzymatiques qui, utilisés seuls, facilitent l'émer-

gence de résistances, comme cela a été observé avec la pyriméthamine et l'atovaquone ;

- domaine II de la synthèse des acides gras (qui sont des constituants essentiels de la membrane parasitaire) impliquant plusieurs enzymes (Fatty Acid Binding Proteins ou FAB B, FAB F et FAB H) et énoyl-ACP (acyl-carrier-protein) réductase) qui sont respectivement inhibées par la thiolactomycine et par le triclosan ;

- système transcriptionnel de type procaryote sur lequel agissent différentes tétracyclines (clindamycine, doxycycline)

Protéases

Les *Plasmodium* disposent d'un équipement protéasique particulièrement important, puisque plus de 90 gènes codent pour des protéases nécessaires à l'invasion des érythrocytes et à la dégradation de l'hémoglobine. Certaines de ces protéases sont absentes chez l'Homme et leurs inhibiteurs sont à l'étude comme antipaludiques potentiels. Il s'agit notamment de :

- la plasmepsine I et II et de la falcipaine, enzymes indispensables aux formes plasmodiales intra-érythrocytaires pour la dégradation de l'hémoglobine en petits peptides permettant la synthèse des acides nucléiques du parasite ;

- les métacaspases, une famille de caspases impliquées dans l'apoptose et absentes chez l'animal ;

- les serine-rich antigen (SERA) protéases, comme la calpaïne et la signalpeptidase I qui correspondent aux cystéines protéases chez l'Homme ;

- du protéasome, qui est un complexe de plusieurs sousunités protéasiques impliqué dans la différenciation et la multiplication des protozoaires. Chez *Plasmodium falciparum*, un de ses inhibiteurs, la lactacystine, a une efficacité prouvée *in vitro*.

Métabolisme énergétique

Plasmodium falciparum est dépourvu de gènes codant pour des enzymes comme l'ATP synthase ou la NADH déshydrogénase qui, dans d'autres espèces, sont essentielles au métabolisme énergétique des mitochondries. En l'absence d'oxygène dans son environnement, *Plasmodium falciparum* ne peut produire de l'ATP que par glycolyse. Sa mitochondrie est dépourvue d'activité de phosphorylation oxydative et possède une chaîne incomplète de transport d'électrons pour produire certaines réactions redox. Une de ces réactions est le couplage de la cytochrome C réductase avec la déshydroorate déshydrogénase. L'atovaquone inhibe la première de ces enzymes et présente une synergie avec le proguanil, auquel il est associé dans une spécialité pharmaceutique (Malarone®). Des inhibiteurs de la déshydroorate déshydrogénase restent, eux, à découvrir.

Régulation de la synthèse protéique

Chez *Plasmodium falciparum*, la régulation de la synthèse protéique ne semble pas uniquement régulée par

des mécanismes transcriptionnels. En effet cette synthèse concerne de nombreuses protéines, variables notamment selon les stades évolutifs; or le génome de *Plasmodium falciparum* comprend relativement peu de gènes de transcription. La fonctionnalité de certains mRNAs est d'ailleurs elle aussi variable. C'est ainsi que des protéines présentes chez les jeunes zygotes – qui sont produits par les gamétocytes – semblent absentes de ces gamétocytes alors que les mRNA correspondants y sont abondants. Il existe donc un mécanisme régulateur lié à une transformation des mRNAs et qui pourrait fournir de nouvelles cibles thérapeutiques.

Ligands parasitaires interagissant avec certaines protéines d'adhérence

Plusieurs protéines d'adhérence jouent un rôle essentiel dans la physiopathologie du paludisme mais aussi dans la pénétration de *Plasmodium falciparum* dans ses cellules-hôtes successives (hépatocytes, érythrocytes). C'est par exemple le cas de la protéine CD81 qui est exprimée à la surface des hépatocytes et dont le ligand parasite pourrait être, lui aussi, une cible thérapeutique.

Au total, plusieurs des cibles thérapeutiques identifiées grâce aux progrès de la génomique et de la biologie moléculaire de *Plasmodium falciparum* concernent des médicaments déjà existants et n'apportent donc pas de véritables nouveautés. D'autres pistes réellement innovantes ont cependant été identifiées et elles seront plus nombreuses encore lorsque seront achevées les études de post-génomique. Cependant, de façon paradoxale, le progrès thérapeutique risque d'être limité non par l'insuffisance des données fondamentales mais par leur trop grande abondance. Les recherches en cours ne peuvent en effet fournir que des cibles potentielles, des «molécules prometteuses». Or on ne soigne pas des malades avec des molécules mais avec des médicaments véritables qui ne sont obtenus qu'au terme d'un processus long (7 à 10 ans), financièrement très onéreux (8 à 12 millions de dollars), techniquement compliqué et toujours aléatoire (le succès final porte sur moins de 1 molécule sur 10 000). Les groupes pharmaceutiques susceptibles de se lancer dans une aventure aussi risquée que le développement de nouveaux antipaludiques sont très peu nombreux. La plupart d'entre eux ont déjà en cours le développement pré-clinique ou clinique de nouveaux antipaludiques et il est presque impossible d'y ajouter – dans un avenir prévisible – le développement de nouveaux principes actifs. Il faudra donc être particulièrement sélectif pour déterminer, parmi toutes les nouvelles cibles thérapeutiques potentielles, les 3 ou 4 cibles qui justifieraient qu'on consacre des moyens nouveaux à leur développement.

NOUVELLES CIBLES VACCINALES

En matière de perspectives vaccinales, les acquis récents concernent surtout les mécanismes d'échappement immunologique de *Plasmodium falciparum* et la

caractérisation de protéines de surface qui sont souvent des protéines d'adhérence.

Le phénomène d'échappement est basé sur la possibilité, pour le *Plasmodium*, de modifier rapidement son équipement antigénique de surface, comme le font d'ailleurs d'autres protozoaires et, notamment, les trypanosomes. La plus grande famille de protéines d'adhérence les *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1 (PfEMP1) est codée par un répertoire d'une cinquantaine de gènes, les gènes *var*. Le mécanisme de commutation entre ces différents gènes reste à découvrir. Sa connaissance pourrait être le point de départ de nouvelles voies vaccinales et expliquer au moins partiellement l'échec de certaines tentatives passées (vaccin SPf66). Curieusement, des protéines PfEMP1, codées par les gènes *var* et *rif* et théoriquement spécifiques des stades intra-érythrocytaires, sont largement exprimées dans d'autres stades plasmodiaux. C'est notamment le cas de la protéine de "knobs" PfEMP13 qui existe aussi dans les stades pré-érythrocytaires et inhibe la pénétration des sporozoïtes dans les hépatocytes. De même, EBA-175 (175-kDa erythrocyte-binding antigen), ligand parasite impliqué dans l'invasion des érythrocytes, est aussi exprimé dans les hépatocytes infectés et à la surface des sporozoïtes. La spécificité antigénique des différents stades évolutifs de *Plasmodium falciparum* est donc probablement moins étroite qu'on ne l'imaginait, ce qui, sur un plan pratique, laisse espérer une plus grande facilité dans l'obtention de vaccins polyvalents, actifs à différentes phases du cycle plasmodial.

D'une façon générale, les progrès récents ont allongé la liste déjà imposante des «protéines-candidates». Il s'agit généralement de protéines d'adhérence des *Plasmodium* à leurs cellules-hôtes (hématies et hépatocytes) ou bien des hématies parasitées à l'endothélium vasculaire. En particulier ont été identifiées de nombreuses protéines des stades exo-érythrocytaires (comme les Liver Stage Protein LSA 1, 2 et 3) ou des sporozoïtes (comme les antigènes STARP Sporozoïte Threonine and Asparagine Rich Protein, SALSA Sporozoïte And Liver Stages Antigens), ce qui pose le problème d'un choix d'autant plus difficile que les modèles expérimentaux sont rares et imparfaits.

Outre le choix de l'antigène le plus efficace, une des difficultés fondamentales de la vaccination antipalustre est la production de ces antigènes en quantité suffisante, ce qui est évidemment inenvisageable à partir des cultures de *Plasmodium falciparum*. Dans ce domaine, d'importants progrès ont été réalisés avec, notamment, l'expression de CS protein (protéine circum-sporozoïte) de *Plasmodium falciparum* par un Cilié facilement multiplié au laboratoire, *Tetrahymena thermophila*.

Quel que soit leur procédé d'obtention, les protéines plasmodiales sont faiblement immunogènes, ce qui contraint à recourir à des systèmes adjuvants permettant en outre d'orienter la réponse immune vers une réponse de type cellulaire, essentielle pour la protection contre les *Plasmodium* endo-cellulaires, ou de type humoral, active contre les formes extra-cellulaires, en particulier les sporozoïtes.

Une solution consiste en l'emploi de vaccins à ADN, c'est-à-dire de plasmides dans lesquels ont été incorporés des gènes codant pour les protéines vaccinales. On réalise ainsi une endosynthèse de ces protéines par le sujet vacciné, pouvant induire une forte réponse immunitaire de type cellulaire. C'est là une voie très étudiée ces dernières années et où les progrès de la génomique et de la biologie moléculaire permettent des avancées déterminantes. Des essais ont été notamment réalisés avec des antigènes CSP- mais avec des résultats assez décevants- ou avec des antigènes de mérozoïtes ou de formes pré-érythrocytaires, entraînant une relative immunité chez des singes, avec un pic secondaire de parasitémie plus faible que chez les animaux témoins. Bien plus ambitieux est un programme international associant plusieurs institutions (MULTI-STAGE Dna-based malaria vaccine Operation) et basé sur l'emploi d'un vaccin comprenant 5 à 15 gènes (MustDO, 5, 10 ou 15) codant pour des protéines antigéniques de différents stades évolutifs du parasite. Le but est d'obtenir ainsi une immunité anti-sporozoïtes et anti-mérozoïtes, de façon à permettre aussi bien la protection des voyageurs que la diminution de la morbidité et de la mortalité chez les populations des zones d'endémie. Diverses voies sont d'ailleurs explorées pour augmenter l'efficacité de ces vaccins à ADN. Il s'agit notamment de l'addition de gènes codant pour des cytokines (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF), en particulier), ou de l'effet adjuvant de vaccinations hétérologues à l'aide d'ADN codant pour des protéines virales. Des essais cliniques de phase 2 sont en cours chez des volontaires, avec un vaccin MuStDO5-GM-CSF. Il est encore trop tôt pour en apprécier les résultats, sachant que, dans l'ensemble, ces vaccins à ADN constituent une voie très ingénieuse et apparemment très prometteuse. Leur utilisation en clinique humaine risque cependant de se heurter à diverses difficultés dont la moindre ne sera pas la crainte – justifiée ou non – de voir ainsi incorporé au génome humain des fragments d'un génome de parasite.

CIBLES VECTORIELLES

Grâce à la connaissance du génome d'*Anopheles gambiae* et à l'étude d'analogies structurales avec le génome de *Drosophila melanogaster*, il est maintenant possible d'aborder par la génotypie le problème de la résistance aux insecticides et d'identifier les gènes (carboxylestérases, glutathion transférase et cytochrome P450) qui en sont responsables. Parallèlement, grâce à la biologie moléculaire, de nouvelles cibles ont été identifiées pour de nouveaux insecticides. De même, nos connaissances de la physiologie de l'insecte et des mécanismes régulant la production d'oocystes ont fait des progrès considérables. C'est ainsi qu'ont été identifiés plus de 70 gènes codant pour des peptides – notamment des neuropeptides et des hormones dont une peptide insuline-like-nécessaires à la reproduction de l'insecte, au cycle sexué du *Plasmodium* et à sa transmission. Plusieurs centaines

de gènes codent pour des récepteurs de protéines G (GPCRs) et contrôlent des aspects essentiels de la vie de l'insecte, 76 d'entre eux étant des récepteurs gustatifs dont dépend la prise des repas sanguins. Ont été également reconnus des gènes impliqués dans les défenses immunitaires de l'anophèle contre les pathogènes eucaryotes, ainsi que des allèles de résistance qui limitent la production d'oocystes et donc la transmissibilité.

L'une des principales applications prévisibles de ces découvertes concerne l'emploi d'anophèles génétiquement modifiés et rendus ainsi incapables d'assurer leur transmission vectorielle. Les outils génétiques existent et plusieurs souches modifiées ont été obtenues. La difficulté pratique est d'obtenir, sur le terrain une substitution des souches sauvages par les souches génétiquement modifiées qui, en l'état actuel des techniques, perdent rapidement leurs gènes marqueurs et ont une compétitivité faible vis-à-vis des populations naturelles. Cette voie semble prometteuse, d'un point de vue conceptuel mais de nombreuses difficultés restent encore à surmonter.

CONCLUSION

Au total, le séquençage du génome de *Plasmodium falciparum* et d'*Anopheles gambiae* constitue une avancée scientifique considérable qui, d'ores et déjà, ouvre de nouvelles voies au contrôle du paludisme. La recherche post-génomique qui se poursuit très activement devrait élargir encore cet éventail de possibilités nouvelles. D'un point de vue médical pratique, il est cependant essentiel de souligner que, de toute façon, plusieurs années seront nécessaires pour que ces découvertes donnent naissance à de nouveaux moyens thérapeutiques ou prophylactiques. Dans l'immédiat, l'urgence est donc de tout mettre en œuvre pour utiliser au mieux les moyens de contrôle actuellement disponibles. Pour l'avenir, l'essentiel sera de savoir opérer un choix très sélectif des quelques nouveaux produits (antipaludiques, vaccins, insecticides) ou des nouveaux procédés (anophèles génétiquement modifiés) qui seront retenus pour un développement et une production industriels, qui, quels que soient les efforts, constitueront la limitation principale.

BIBLIOGRAPHIE

- Bhardwaj D., Hora B., Singh N. *et al.*, Immunogenicity and protective efficacy of three DNA vaccines encoding pre-erythrocytic and erythrocytic stage antigens of *Plasmodium falciparum* in rhesus monkey. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2002, 34, 33-43.
- Boete C. & Koella J. C., Evolutionary ideas about genetically manipulated mosquitoes and malaria control. *Trends Parasitol.*, 2003, 19, 32-38.
- Butler D., What difference does a genome make? *Nature*, 2002, 419, 426-428.
- Catterucia F., Godfray H. C. & Crisanti A., Impact of genetic manipulation on the fitness of *Anopheles stephensi* mosquitoes. *Science*, 2003, 21, 1225-1227.

- Jomaa H., Wiesner J., Sanderbrand S. *et al.*, Inhibitors of the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. *Science*, 1999, 285, 1502-1503.
- Coluzzi M. & Costantini C., An alternative focus in strategic research on disease vectors: the potential of genetically modified non biting mosquitoes. *Parassitologia*, 2002, 44, 131-135.
- Duffy M. F., Reeder J. C. & Brown G. V., Regulation of antigenic variation in *Plasmodium falciparum*: censoring freedom of expression? *Trends Parasitol.*, 2003, 19, 121-124.
- Epstein J. E., Gorak E. J., Charoenvit Y. *et al.*, Safety, tolerability and lack of antibody responses after administration of a PfCSP DNA malaria vaccine via needle-free jet injection, and comparison of intramuscular and combination intramuscular/intradermal routes. *Hum.Gen.Ther.*, 2002, 13, 1551-1560.
- Florens L., Washburn M. P., Raine J. D. *et al.*, A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Nature*, 2002, 419, 520-526.
- Foth B. J., Ralph S. A., Tonkin C. J. *et al.*, Dissecting apicoplast targeting in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science*, 2003, 299, 705-708.
- Fox A. N., Pitts R. J. & Zwiebel L. J., A cluster of candidate odorant receptors from the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. *Chem. senses*, 2002, 27, 453-459.
- Gruner B. J., Brahimi K., Letourneur F. *et al.*, Expression of the erythrocyte-binding antigen 175 in sporozoites and in liver stages of *Plasmodium falciparum*. *J. Infect. Dis.*, 2001, 184, 892-897.
- Gruner B. J., Brahimi K., Eling W. *et al.*, The *Plasmodium falciparum* knob-associated PfEMP13 antigen is also expressed at the pre-erythrocytic stages and induces antibodies which inhibit sporozoite invasion. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 2001, 112, 253-261.
- Gruner C. A., Snounou G., Brahimi K. *et al.*, Pre-erythrocytic antigens of *Plasmodium falciparum*: from rags to riches? *Trends Parasitol.*, 2003, 19, 74-78.
- Hemingway J., Field L. & Vontas J., An overview of insecticide resistance. *Science*, 2002, 298, 96-97.
- Ito J. *et al.*, Transgenic anopheline mosquitoes impaired in transmission of a malaria parasite. *Nature*, 2002, 417, 453-455.
- Joachimik M. P., Chang C., Rosenthal P. J. *et al.*, The impact of whole genome sequence data on drug discovery – a malaria case study. *Mol. Med.*, 2001, 1, 698-710.
- Jomaa H., Wiesner J., Sanderbrand S. *et al.*, Inhibitors of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. *Science*, 1999, 285, 1502-1503.
- Kumar S., Epstein J. E., Ritchie T. L. *et al.*, A multilateral effort to develop DNA vaccines against *falciparum* malaria. *Trends Parasitol.*, 2002, 18, 129-135.
- Land K. M., The mosquito genome: perspectives and possibilities. *Trends Parasitol.*, 2003, 19, 103-105.
- Lekana Douki J. B., Sterkers Y., Lepolard C. *et al.*, Adhesion of normal and *P. falciparum* ring-infected erythrocytes to endothelial cells and the placenta involves the rhoptry-derived Ring Surface Protein-2. *Blood*, 2003, 100, 1478-1483.
- Lell B., Ruangweera R., Wiesner J. *et al.*, Fosmidomycin, a novel chemotherapeutic agent for malaria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2003, 47, 735-738.
- Niare O., Markianos K., Volz J. *et al.*, Genetic loci affecting resistance to human malaria parasites in a west African mosquito vector population. *Science*, 2002, 298, 213-216.
- Paugam A., Bulteau A.-L., Dupouy-Camet J. *et al.*, Characterization and role of protozoan parasite proteasomes. *Trends Parasitol.*, 2003, 19, 55-59.
- Peters J., Fowler E., Gatton M. *et al.*, High diversity and rapid change over of expressed var genes during the acute phase of *Plasmodium falciparum* infections in human volunteers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99, 10689-10694.
- Ranson H., Claudianos C., Ortel F. *et al.*, Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science*, 2002, 298, 179-181.
- Ranson H., Nikou D., Hutchinson M. *et al.*, Molecular analysis of multiple cytochrome P450 genes from the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Insect Mol. Biol.*, 2002, 11, 409-418.
- Rathod P. K., Ganesan K., Hayward R. E. *et al.*, DNA microarrays for malaria. *Trends Parasitol.*, 2002, 18, 39-45.
- Ritchie T. L. & Saul A., Progress and challenges for malaria vaccines. *Nature*, 2002, 415, 694-701.
- Robinson B. A., Welch T. L. & Smith J. D., Widespread functional specialization of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 family members to bind CD 36 analysed across a parasite genome. *Mol.Microbiol.* 2003, 47, 1265-1278.
- Surolia N. & Surolia A., Triclosan offers protection against blood stages of malaria by inhibiting enoyl-ACP reductase of *Plasmodium falciparum*. *Nat.Med.*, 2001, 7, 167-173.
- Thomassova D., Ton L. Q. & Copley R. R. *et al.*, Comparative genomic analysis in the region of a major *Plasmodium-refractoriness* locus of *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99, 8179-8184.
- Wiesner J., Henschke D., Hutchinson D. B. *et al.*, *In vitro* and *in vivo* synergy of fosmidomycin, a novel antimalarial drug, with clindamycin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002, 46, 2889-2894.
- Wu Y., Wang X., Liu X. & Wang Y., Data-mining approaches reveal hidden families of proteases in the genome of malaria parasite. *Genome Res.*, 2003, 13, 601-616.
- Wyrt D. F., The parasite genome: biological revelations. *Nature*, 2002, 419, 495-496.
- Zuegg 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.