

## NOUVELLES APPROCHES MÉTHODOLOGIQUES DANS LA RECHERCHE DE MOLÉCULES ANTIMALARARIQUES

R. GOZALBES, N. MAHMOUDI, D. MAZIER, M. DANIS, F. DEROUIN

*Med Trop* 2004; **64** : 66-70

**RESUME** • La situation mondiale du paludisme à *Plasmodium falciparum* reste très préoccupante, avec 300 à 500 millions de cas par an et une extension des résistances aux différents anti-paludéens. L'identification de nouvelles cibles pharmacologiques et la synthèse de nouvelles molécules doit donc être une priorité de la recherche pharmacologique contre le paludisme. Actuellement les démarches pharmacologiques classiques utilisées pour la recherche de nouveaux composés se heurtent aux difficultés de l'évaluation expérimentale de l'activité anti-parasitaire, *in vitro* et *in vivo*. Ces dernières décennies, sont apparus de nouveaux outils mathématiques permettant d'orienter la synthèse de molécules actives par une prédiction préalable de leurs propriétés biologiques et pharmacocinétiques. Différentes approches sont proposées, reposant, dans un premier temps, sur une caractérisation bi- ou tri-dimensionnelle des données structurales et physico-chimiques des molécules et de leurs cibles parasitaires. L'analyse mathématique et statistique des relations entre la structure moléculaire et l'activité biologique permet ensuite d'établir des modèles capables de prédire l'activité d'une molécule. Ces modèles peuvent être appliqués au criblage de larges bases de données moléculaires mais aussi à la conception de nouvelles structures actives, par synthèse virtuelle. L'intégration récente des données génomiques sur *Plasmodium* permet d'enrichir ces approches mathématiques et d'ouvrir de nouvelles voies dans la recherche des anti-paludiques.

**MOTS-CLES** • Paludisme - Antipaludique - Analyse structure-activité - Modélisation moléculaire.

### NEW STRATEGIES FOR SCREENING AND DESIGN OF NEW ANTIMALARIAL DRUGS

**ABSTRACT** • The estimated worldwide incidence of *Plasmodium falciparum* malaria is about 500 million cases a year. In tropical areas, the dramatic increase of resistance to most antimalarial drugs is directly responsible for persistent widespread high endemicity and related morbidity. The search to identify new drug targets and agents is a high priority. However the value of standard pharmacological research methods is greatly diminished by technical problems involving *in vitro* and *in vivo* modeling of malaria infection. In recent decades new mathematical tools have been developed to predict drug properties and to estimate biological activity *in silico*. Various approaches have been proposed based on 2D or 3D descriptions of the chemical structure of the drug and target followed by mathematical and statistical characterization of their interaction. These techniques are now widely used in medicinal chemistry and have proven their efficacy for screening the anti-malarial activity of numerous molecules in large databases and for virtual synthesis. Incorporating new knowledge from the genomic studies of *Plasmodium* has markedly increased the performance and range of application of these tools for identifying new drug targets against malaria.

**KEY WORDS** • Malaria - Antimalarial - Structure analysis-activity - Molecular modeling - QSAR.

Malgré les efforts et ressources consacrés à la lutte contre le paludisme et les connaissances acquises sur les diverses espèces de *Plasmodium*, le paludisme reste la première endémie parasitaire mondiale. L'un des facteurs

majeurs qui a contribué à la détérioration de la situation du paludisme ces dernières années est l'apparition de résistances de *Plasmodium falciparum* aux différentes molécules antipaludiques. La recherche de nouvelles molécules actives apparaît donc comme une priorité (1). Elle doit être orientée vers l'identification de têtes de série originales et de nouvelles cibles thérapeutiques puis conduire à la synthèse de composés actifs et bien tolérés.

A ces objectifs de recherche rigoureux s'opposent des contraintes techniques très fortes pour *Plasmodium*.

La culture en continu des stades érythrocytaires est possible mais reste très difficilement adaptable pour des tests pharmacologiques en grande série. Celle des stades hépatiques est encore plus difficile, réservée à quelques laboratoires de recherche qui peuvent disposer de cultures d'hépatocytes (humains pour *P. falciparum*) et de sporozoïtes.

Les modèles expérimentaux sur petit animaux (pour *P. yoelii yoelii*, *P. berghei*) apportent des informations limi-

• Travail du Laboratoire de Parasitologie-Mycologie (EA3520) (R.G., Docteur en pharmacie et Docteur en Sciences ; adresse actuelle : CEREP, Département de modélisation moléculaire, Rueil-Malmaison, F.D. Professeur des universités, Praticien hospitalier, Chef de service, Université Paris 7 et Hôpital Saint-Louis, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, France) et de l'Unité INSERM 511 -Immunobiologie cellulaire et moléculaire des infections parasitaires- (N.M., Doctorante ; D.M., Professeur des universités, Praticien hospitalier et Directeur de l'Unité ; M.D., Professeur des universités, Praticien hospitalier, Chef de service), CHU Pitié Salpêtrière, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Université Paris et Marie Curie, Paris, France •

• Correspondance : F. DEROUIN, Laboratoire de Parasitologie (EA 3520), Faculté de médecine, 15 rue de l'École de médecine, 75006 Paris, France • Fax 01 43 29 51 92 •

• E-mail : paracord@wanadoo.fr •

• Article reçu le 1/09/2003, définitivement accepté le 17/03/2004.

tées et pas toujours transposables à *P. falciparum* et à l'homme. Les modèles de paludisme à *P. falciparum* réalisés chez les souris immunodéprimées (2) ou les primates sont peu accessibles et inadaptés aux étapes initiales de la recherche pharmacologique.

Les démarches pharmacologiques « classiques » ont été appliquées pour la recherche des antimalariques :

- le criblage des produits naturels puis l'identification, la purification et la synthèse du ou des principes actifs. L'exemple du quingaochu et de l'artémisinine est très démonstratif de la pertinence de cette démarche (3) ;

- la synthèse chimique de différents composés dérivés d'un composé référent ayant une activité reconnue. Cette démarche permet souvent d'améliorer l'efficacité ou la tolérance au sein d'une famille médicamenteuse mais ne permet pas en soi d'identifier de nouvelles têtes de série.

Ces approches restent performantes et sont encore très utilisées bien qu'elles soient très limitées par les contraintes techniques de la culture et de l'évaluation de l'activité antiparasitaire. Les techniques de criblage à haut débit ne sont par exemple pas applicables à la culture de *Plasmodium*, ce qui rend très difficile, voire impossible une évaluation reproductible et exhaustive des nombreux dérivés possibles d'une molécule active.

A partir du début des années quatre-vingts, des approches rationnelles de la conception de médicaments, reposant sur l'étude et la caractérisation de la structure moléculaire, se sont développées et continuellement affinées. Leur principal avantage est la possibilité de synthétiser uniquement des composés dont on peut prévoir au préalable leur activité biologique, leur toxicité et/ou leurs paramètres pharmacocinétiques.

Le principe des techniques les plus couramment utilisées associe le recueil des données structurales et physico-chimiques sur les molécules et leurs cibles pharmacologiques, leur « traitement » mathématique pour modéliser l'activité ou l'interaction avec la cible, puis l'application des modèles obtenus au criblage de larges bases de données moléculaires.

### CONCEPTION STRUCTURALE DE MÉDICAMENTS

Cette approche consiste en l'identification des sous-structures moléculaires responsables de l'activité thérapeutique (pharmacophores), soit à partir des structures de composés d'activité connue (*Ligand-Based Drug Design*, LBDD), soit de la connaissance préalable de la structure tridimensionnelle du récepteur concerné (*Structure-Based Drug Design* (SBDD)).

### Recherche basée sur la structure de composés d'activité pharmacologique connue (LBDD)

C'est une approche très souvent utilisée dans la recherche de nouveaux composés. Par exemple, pour *Plasmodium*, Riel et Coll (4) ont pu caractériser le nombre et la position de certains groupes chimiques (accepteurs et donneurs d'hydrogènes, sites aromatiques et hydrophobiques,

etc.) responsables de l'activité anti-paludique des benzimidazoles, puis appliquer cette information sur une base de données de 250 000 composés afin d'identifier ceux qui présenteraient la meilleure structure pharmacophore. Pour ce travail, ils ont utilisé un logiciel spécifique (Catalyst®, de la société Accelrys) qui intègre l'analyse conformationnelle des structures, la recherche automatique du ou des pharmacophores et l'analyse tridimensionnelle (3D) des structures (5). Ce même logiciel a été utilisé pour l'étude de dérivés semi-synthétiques des trioxanes (6) et a permis de révéler l'existence de pharmacophores actifs sur *Plasmodium* chez certains inhibiteurs de la reverse transcriptase du VIH1 (7).

### Recherche basée sur la structure des récepteurs moléculaires (SBDD)

Cette approche est de plus en plus utilisée grâce à l'amélioration de techniques comme la cristallographie par rayons X ou résonance magnétique nucléaire (8). Les structures cristallographiques sont souvent disponibles à partir de bases de données publiques comme par exemple la *Protein Data Bank* (9). Même dans les cas où la structure 3-D des récepteurs n'est pas disponible, ce qui est souvent le cas pour les récepteurs parasitaires, il est possible de les modéliser à partir de la séquence des acides aminés (*homology modeling*) et conduire ensuite une recherche de pharmacophore (10).

Lorsque la structure 3-D du récepteur est disponible (ou modélisée) et que l'on connaît aussi la structure des candidats médicaments, il est possible de tester leurs interactions moléculaires directes par la technique de *docking*. Différents programmes de modélisation permettent d'analyser les possibles liaisons théoriques entre ligand et récepteur, ainsi que l'évaluation ordonnée des meilleurs candidats en fonction de leur géométrie et de leur capacité d'interaction chimique avec le récepteur (par exemple en fonction des charges, de la capacité d'établir des liaisons hydrogènes avec les groupes voisins, etc.) (11).

### UTILISATION DES MODÈLES MATHÉMATIQUES : PRÉDICTION D'ACTIVITÉ, SYNTHÈSE VIRTUELLE

Ces modèles permettent de caractériser la relation entre la structure moléculaire et l'activité biologique ou les propriétés physico-chimiques des molécules. Ce type d'analyse est plus connue sous les acronymes anglais « QSAR » et « QSAR » (*Quantitative Structure-Property Relationships* et *Quantitative Structure-Activity Relationships*). La réalisation de ces modèles comporte deux étapes complémentaires : la caractérisation numérique des molécules puis le traitement mathématique et statistique de ces données numériques par rapport aux données d'activité.

### La caractérisation numérique des molécules

Elle a pour but de permettre une identification spécifique de chaque molécule. Dans les premiers travaux publiés, les composés étaient identifiés par quelques paramètres physico-chimiques simples tels que la lipophilie ou la taille de la molécule. Cependant, avec ces paramètres, plusieurs compo-

sés pouvaient partager les mêmes valeurs, ce qui a motivé l'évolution vers l'utilisation de descripteurs plus faciles à calculer et plus représentatifs de la structure moléculaire.

Les descripteurs bidimensionnels sont des descripteurs basés sur la structure plane de la molécule, qui caractérisent des aspects tels que forme, taille, nombre d'atomes, nombre et type de liaisons inter-atomiques, etc. de la molécule. Parmi ces descripteurs les « indices topologiques » (ITs) sont particulièrement performants. Pour une seule molécule, plusieurs centaines d'ITs peuvent être calculés et leur ensemble représente une véritable « empreinte digitale », unique pour chaque molécule (12). Ces descripteurs présentent plusieurs avantages :

- il n'est pas nécessaire d'effectuer des mesures expérimentales pour les calculer, et aucune connaissance sur la structure du récepteur ou le mécanisme d'action des molécules n'est requise ;

- toute structure chimique peut être décrite par ses ITs, même celle de composés « virtuels » qui n'ont pas encore été synthétisés ;

- ce sont des descripteurs très simples et rapides à calculer sur un simple ordinateur, de type PC.

Un exemple d'application des ITs dans la recherche de nouveaux composés antipaludiques a permis l'identification de nouvelles têtes de série (13).

L'analyse topologique présente cependant l'inconvénient de ne pas prendre en compte la nature et la conformation de la cible pharmacologique et de ne pas pouvoir discriminer l'activité d'isomères d'une même molécule.

Les descripteurs tridimensionnels : la technique la plus connue est le « CoMFA » (*Comparative Molecular Field Analysis*). Cette méthode, développée en fin des années quatre-vingt, peut s'avérer mieux adaptée pour l'identification des interactions ligand-récepteur (14). Pour construire les descripteurs tridimensionnels, les composés à analyser doivent être d'abord superposés les uns aux autres, sur la base d'un squelette structural commun ou d'une structure pharmacophorique connue. Chaque molécule est définie par un ensemble de points, dont leurs valeurs stériques et électrostatiques dans l'espace sont calculées et corrélées mathématiquement avec les données d'activité pour établir la relation QSAR. Après validation statistique de l'analyse réalisée, un modèle du pharmacophore dans l'espace peut être obtenu, et une représentation tridimensionnelle indique les régions moléculaires les plus favorables/défavorables à l'activité. Des structures hypothétiques peuvent être alors proposées, et leurs activités prédites. Cette technique est particulièrement intéressante quand la structure du récepteur est connue et que l'on effectue au préalable un « docking » (voir ci-dessus), car ceci permet de placer correctement le ligand dans l'entourage du récepteur, et de construire le modèle QSAR sur des données plus proches de la réalité.

### Traitement mathématique et statistique des données

Le traitement mathématique et statistique permet la sélection des variables et la détermination d'une équation reliant de façon optimale la structure et l'activité. Deux grands types de méthodes sont possibles :

Les analyses linéaires, comme par exemple l'analyse linéaire discriminante (*Linear Discriminant Analysis*, LDA) ou la régression multilinéaire (*Multilinear Regression Analysis*, MRA).

La technique d'analyse discriminante permet d'établir un modèle de discrimination entre les molécules considérées actives et celles considérées comme inactives. Ceci est particulièrement utile dans le cas de grandes bases de données issues de la chimie combinatoire, car l'on peut facilement effectuer un premier tri (« actif »/« inactif ») sur des milliers de molécules, sans tenir compte de leur mode d'action. L'équation permettant la discrimination peut aussi être appliquée à des molécules qui n'ont pas été évaluées expérimentalement pour en prédire leur activité ou leur absence d'activité. Il ne permet cependant pas d'identifier les structures actives des molécules, mais représente un bon moyen pour identifier une « tête de série » ou une famille de molécules dont aucun élément ne permettait, *a priori*, de soupçonner une activité anti-plasmodiale.

Le traitement par régression multilinéaire est plus précis, car il permet de relier les descripteurs structuraux (par exemple les ITs) à la concentration responsable de l'activité biologique (CI<sub>50</sub> par exemple). L'équation de corrélation est établie puis validée sur un certain nombre de molécules dont les concentrations inhibitrices sont connues ou déterminées expérimentalement, puis elle est appliquée à de nouvelles molécules, dont on peut ainsi prévoir la CI<sub>50</sub>. Outre la précision supérieure de cette approche par rapport à l'analyse discriminante, cette méthode d'analyse permet d'identifier les pharmacophores et prédire l'effet de différentes substitutions. Par exemple, si une molécule possédant les radicaux R1, R2, R3 et R4 a une activité inhibitrice en culture à la concentration de « x » mg/ml, on peut virtuellement enlever ou modifier un ou plusieurs radicaux et estimer l'impact de ce changement sur la concentration inhibitrice prédite, comme nous l'avons appliqué sur plusieurs molécules actives sur *Toxoplasma gondii* (15).

D'autres méthodes mathématiques d'analyse non linéaire ont été récemment développées pour traiter les situations où les analyses linéaires se révèlent insuffisantes. En effet, les analyses non linéaires ont l'avantage d'être des méthodes adaptatives, aptes à modifier le modèle construit en fonction de nouvelles données. Ainsi, l'analyse par réseaux de neurones est une des plus performantes (16). Ces réseaux sont des systèmes basés sur l'architecture simplifiée du cerveau humain, et essayent de reproduire son fonctionnement. Un réseau est constitué de « nodes » ou « neurones », qui sont des unités de calcul disposées sur plusieurs niveaux reliés entre eux : un niveau « d'entrée » qui intègre les variables initiales, un ou plusieurs niveaux « intermédiaires » qui traitent l'information. Ces neurones ont la capacité de traiter l'information qui leur est fournie (les valeurs des descripteurs choisis), de façon à trouver la meilleure combinaison de ces descripteurs pour donner une valeur de sortie souhaitée (la valeur d'activité). Les niveaux de traitement sont interactifs et conduisent à un niveau de « sortie » qui donne le résultat final du réseau. Cette architecture permet donc d'effectuer une analyse complexe et évolutive, du fait des interactions

permanentes entre les niveaux de traitement des informations. Cependant, le traitement effectué aux différents niveaux reste une véritable « boîte noire » ce qui ne permet pas d'interpréter facilement les modèles construits en fonction des descripteurs utilisés. Ce type d'analyse a été appliqué à l'étude de 345 inhibiteurs de la DHFR de *T. gondii* et *P. carinii* (17) et pourrait être envisagé pour *Plasmodium*.

Un autre exemple d'analyse mathématique non linéaire est représenté par les algorithmes génétiques, fondés sur la théorie de l'évolution darwinienne, selon laquelle chaque génération d'une espèce est améliorée par combinaison des meilleurs de ses individus. Les algorithmes génétiques travaillent donc sur des « individus » (structures moléculaires), qui sont des solutions potentielles d'un problème à résoudre (une activité pharmacologique). Une évaluation préliminaire de chaque individu permet de juger de la pertinence des solutions possibles, et à l'élimination des moins performants. Les individus conservés sont combinés virtuellement entre eux et voire même « mutés », de façon à obtenir une nouvelle population (ensemble de molécules) mieux adaptée (plus efficace) que la précédente, et ainsi de suite. La population initiale donne lieu donc à des générations successives, et à la fin de ce processus l'on retrouve les « survivants », qui représentent la meilleure des solutions possibles au problème initialement posé (18).

### Le criblage et la synthèse virtuels

Après la détermination du modèle QSAR le plus performant, l'évaluation d'un très grand nombre de structures est possible en soumettant systématiquement au modèle mathématique différentes substitutions sur les principaux radicaux des molécules. Ainsi, des milliers de molécules peuvent être rapidement générées par ordinateur (Chimie Combinatoire Virtuelle), et soumises aux filtres QSAR (Criblage Informatique Virtuel) de façon à sélectionner les meilleurs « têtes de série » ou « hits », et d'orienter la synthèse chimique, en la limitant aux molécules prédites les plus actives (12).

### L'APPORT DE LA GÉNOMIQUE

Les bases de données résultant du séquençage du génome de *P. falciparum* (19) ont ouvert de nouvelles voies de recherche pharmacologique en identifiant de très nombreux gènes codant pour des fonctions essentielles à la survie du parasite ou à son pouvoir pathogène. Ces fonctions représentent des cibles pharmacologiques potentielles qu'il est possible d'explorer en combinant bio-informatique, modélisation mathématique et statistique (20).

L'analyse bio-informatique et phylogénique est essentielle, dans un premier temps, afin de caractériser la spécificité de ces cibles dont certaines sont trop conservées pour être spécifiques.

Secondairement, la cible doit être identifiée et, si possible, produite. Dans la situation idéale, le gène codant pour la cible identifiée peut être transcrit et cloné, permettant d'en produire une quantité suffisante pour créer un test spécifique,

éventuellement adaptable à une technique de criblage à haut débit. En l'absence de synthèse, l'exploration de cette cible est cependant possible grâce à la modélisation mathématique. En effet, à partir de la séquence du gène et de la séquence protéique qui peut en être déduite, la structure de la cible peut être remodelée et testée, de façon virtuelle, vis à vis de molécules potentiellement inhibitrices (21). Les méthodes d'analyse exposées précédemment peuvent être appliquées, notamment celles qui reposent sur l'analyse 3D et le docking. Les molécules identifiées comme actives peuvent alors faire l'objet d'une évaluation *in vitro*.

Ces démarches sont actuellement en plein développement et ont déjà fait l'objet d'application pour *Plasmodium*, par exemple avec l'identification d'inhibiteurs des falcipain-2 et -3 de *Plasmodium falciparum*, protéases dont l'existence et la structure ont été déduites du séquençage de *Plasmodium* (22). De même, plusieurs protéines kinases parasitaires ont été identifiées comme cibles pharmacologiques potentielles. En effet, par analogie avec leurs homologues supposés dans d'autres systèmes eucaryotes chez lesquels le rôle de ces enzymes est bien établi, il semble probable que certaines kinases parasitaires soient essentielles à la prolifération ou au développement du parasite. Plusieurs protéines-kinases parasitaires recombinantes ont été exprimées dans *E. coli* et se sont avérées actives *in vitro* sur *P. falciparum*, ouvrant la possibilité de réaliser des tests d'inhibition en grande série (23). Des opérations de criblage de chimiothèques ou de banques d'extraits naturels sont en cours sur certaines de ces enzymes.

### CONCLUSION

Cette brève revue montre clairement que la recherche pharmacologique en parasitologie doit maintenant être multidisciplinaire, associant parasitologues, pharmacologues, bio-informaticiens, et chimioinformaticiens spécialistes de la modélisation. C'est la condition indispensable pour pouvoir intégrer et exploiter au mieux les très nombreuses données disponibles, tant sur les structures et propriétés des molécules candidates que sur les cibles potentielles du parasite. L'expérience montre, et ce n'est qu'un début, que le rendement de ce type de recherche est très nettement supérieur à celui de la pharmacologie classique et, surtout, qu'elle représente une approche plus rationnelle et plus évolutive dans la découverte de nouvelles molécules actives. Cette approche multidisciplinaire et complémentaire est appliquée couramment dans la recherche de nouveaux médicaments dans l'industrie pharmaceutique, et son utilisation systématique pour le paludisme pourrait représenter une avancée majeure pour l'obtention d'antipaludiques plus performants.

### RÉFÉRENCES

- 1 - RIDLEY RG - Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. *Nature* 2002; **415** : 686-693.
- 2 - MORENO A, BADELL E, VAN ROOIJEN N, DRUILHE P - Human malaria in immunocompromised mice: new *in vivo* model for chemotherapy studies. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45** : 1847-1853.

- 3 - HIEN TT, WHITE NJ - Qinghaosu. *Lancet* 1993; **341** : 603-608.
- 4 - RIEL MA, KYLE DE, BHATTACHARJEE AK, MILHOUS WK - Efficacy of proton pump inhibitor drugs against *Plasmodium falciparum* *in vitro* and their probable pharmacophores. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; **46** : 2627-2632.
- 5 - KUROGI Y, GÜNER OF - Pharmacophore modeling and three-dimensional database searching for drug design using Catalyst. *Curr Med Chem* 2001; **8** : 1035-1055.
- 6 - GRIGOROV M, WEBER J, TRONCHET JM *et Coll* - A QSAR study of the antimalarial activity of some synthetic 1,2,4-trioxanes. *J Chem Inf Comput Sci* 1997; **37** : 124-130.
- 7 - GRIFFITH R, CHANPHEN R, LEACH SP, KELLER PA - New antimalarial compounds from database searching. *Bioorg Med Chem Lett* 2002; **12** : 539-542.
- 8 - WERBOVETZ KA - Target-based drug discovery for malaria, leishmaniasis, and trypanosomiasis. *Curr Med Chem* 2000; **7** : 835-860.
- 9 - BERMAN HM, WESTBROOK J, FENG Z *et Coll* - The protein data bank. *Nucl Acids Res* 2000; **28** : 235-242.
- 10 - RING CS, SUN E, MCKERROW JH, LEE GK *et Coll* - Structure-based inhibitor design by using protein models for the development of antiparasitic agents. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90** : 3583-3587.
- 11 - CHENG F, SHEN J, LUO X *et Coll* - Molecular docking and 3-D-QSAR studies on the possible antimalarial mechanism of artemisinin analogues. *Bioorg Med Chem* 2002; **10** : 2883-2889.
- 12 - GOZALBES R, DOUCET JP, DEROUIN F - Application of topological descriptors in QSAR and drug design : history and new trends. *Curr Drug Targets Infect Disord* 2002; **2** : 93-102.
- 13 - GOZALBES R, GALVEZ J, MORENO A, GARCIA-DOMENECH R - Discovery of new antimalarial compounds by use of molecular connectivity techniques. *J Pharm Pharmacol* 1999; **51** : 111-117.
- 14 - AVERY MA, ALVIM-GASTON M, RODRIGUES CR *et Coll* - Structure-activity relationships of the antimalarial agent artemisinin. 6. The development of predictive *in vitro* potency models using CoMFA and HQSAR methodologies. *J Med Chem* 2002; **45** : 292-303.
- 15 - GOZALBES R, BRUN-PASCAUD M, GARCIA-DOMENECH R *et Coll* - Anti-toxoplasma activities of 24 quinolones and fluoroquinolones *in vitro*: prediction of activity by molecular topology and virtual computational techniques. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44** : 2771-2776.
- 16 - MANALLACK DT, LIVINGSTONE DJ - Neural networks in drug discovery; have they lived up to their promise? *Eur J Med Chem* 1999; **34** : 195-208.
- 17 - MATTIONI BE, JURIS PC - Prediction of dihydrofolate reductase inhibition and selectivity using computational neural networks and linear discriminant analysis. *J Mol Graph Model* 2003; **21** : 391-419.
- 18 - DEVILLERS J - Genetic Algorithms in Computer-Aided Molecular Design. In «DEVILLERS J - Genetic Algorithms in Molecular Modeling». Academic Press Limited ed, London, 1996, pp 1-34.
- 19 - KISSINGER JC, BRUNK BP, CRABTREE J *et Coll* - The *Plasmodium* genome database. *Nature* 2002; **419** : 490-492.
- 20 - VOLKER C, BROWN JR - Bioinformatics and the discovery of novel anti-microbial targets. *Curr Drug Targets Infect Disord* 2002; **2** : 279-90.
- 21 - AGRAFIOTIS DK, LOBANOV VS, SALEMME FR - Combinatorial informatics in the post-genomics ERA. *Nat Rev Drug Discov* 2002; **1** : 337-346.
- 22 - JOACHIMIAK M.P., CHANG C., ROSENTHAL P.J., COHEN F.E. The impact of whole genome sequence data on drug discovery a malaria case study. *Mol Med* 2001; **7** : 698-710.
- 23 - DOERIG C, MEIJER L, MOTTRAM J - Protein kinases as drug targets in parasitic protozoa. *Trends Parasitol* 2002; **18** : 366-371.