

MUSEUM NATIONAL



D'HISTOIRE NATURELLE

Evaluation du potentiel thérapeutique de PfA-M1, une zinc-aminopeptidase de *Plasmodium falciparum*

Isabelle Florent¹, Marion Flipo², Odile Hato³, Philippe Grellier¹, Rébecca Déprez-Poulain², Jean-Bosco Ouédraogo³

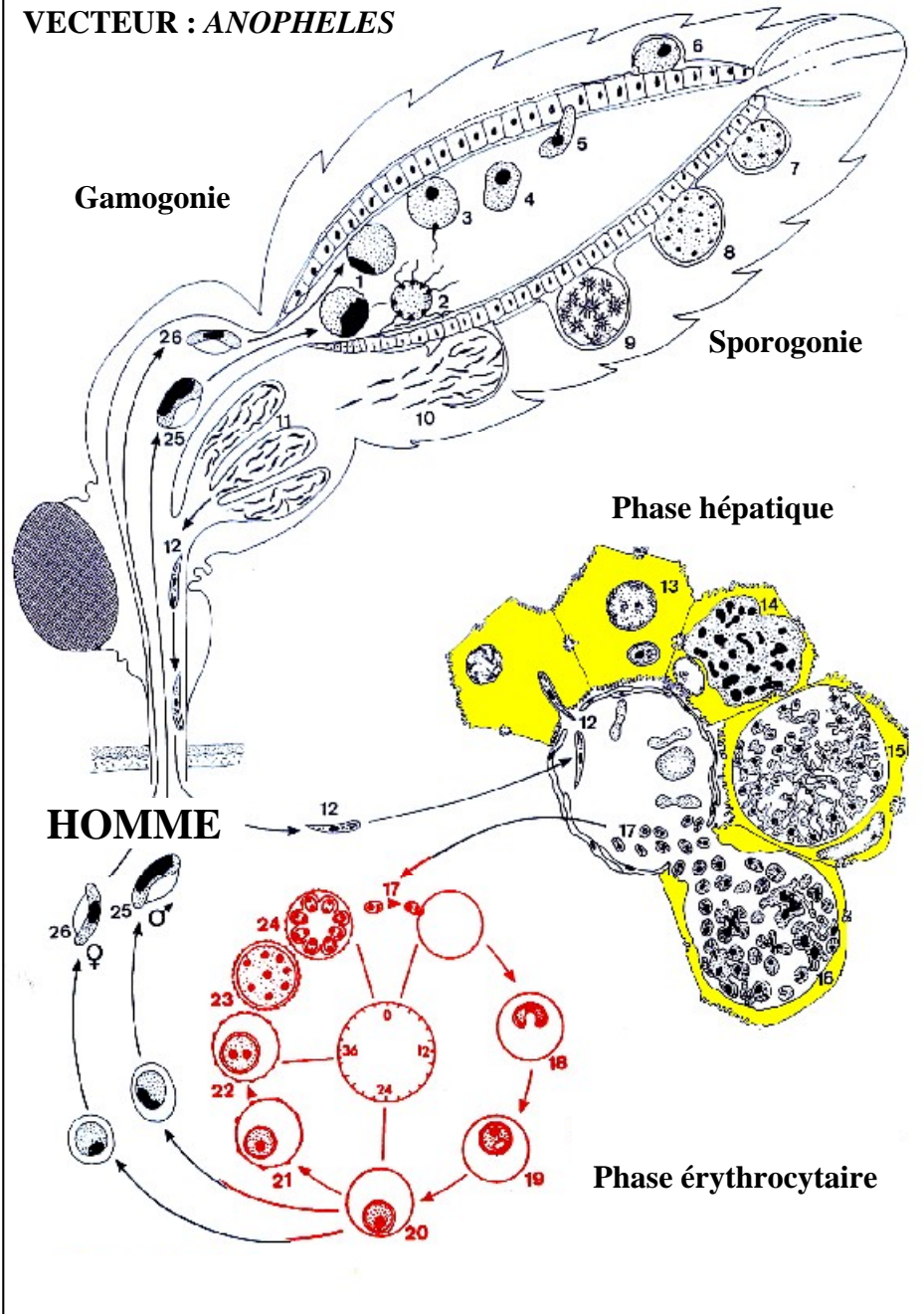
¹, USM504 Biologie Fonctionnelle des Protozoaires, MNHN, Paris

², UMR CNRS 8525, Institut Pasteur de Lille, Faculté de Pharmacie, Lille

³, Institut de Recherches en Sciences de Santé, Centre Muraz, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

43ème réunion du GPLF, 18 mai 2005

VECTEUR : ANOPHELES



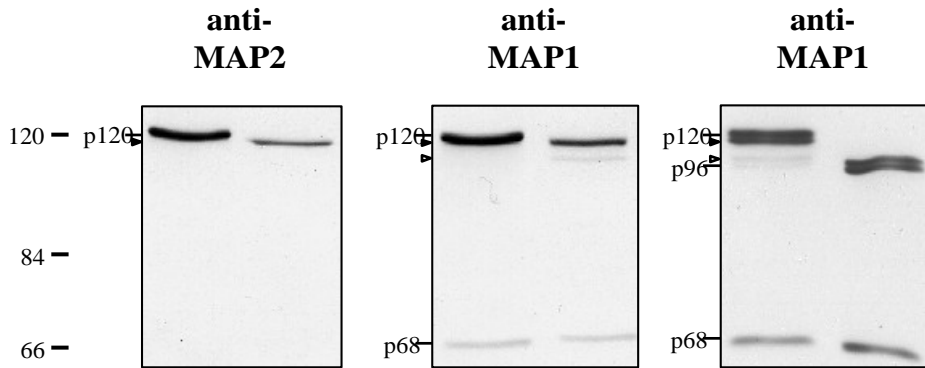
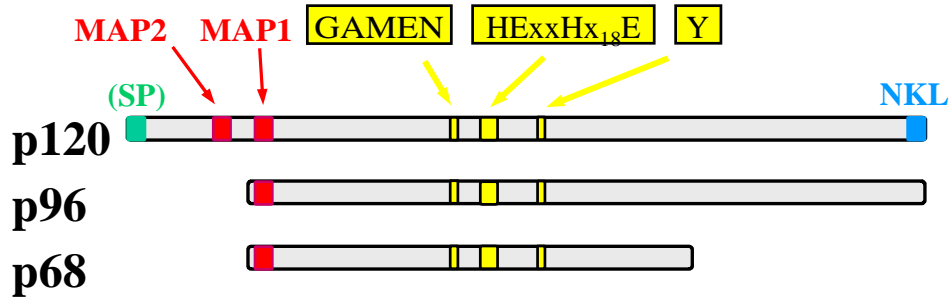
Paludisme

- > 40% de la population mondiale
- 1,5 à 2,7 millions de morts par an
 - Chimiorésistances
 - pas de vaccin

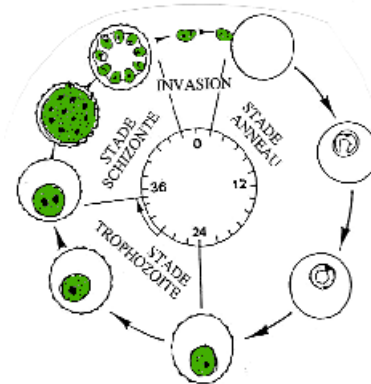
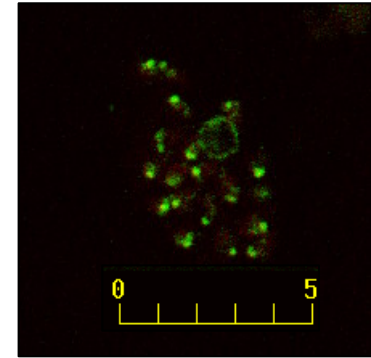
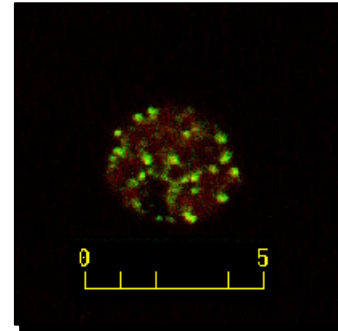
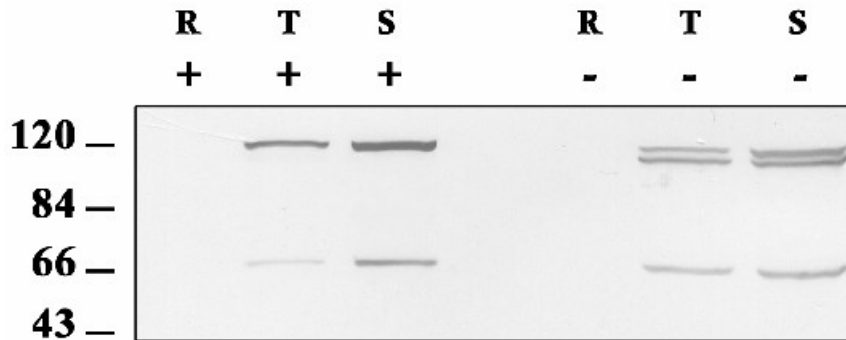
→ besoin urgent de nouveaux types de molécules inhibitrices du développement parasitaire

- 1) approche « systématique »
- 2) approche « rationnelle »

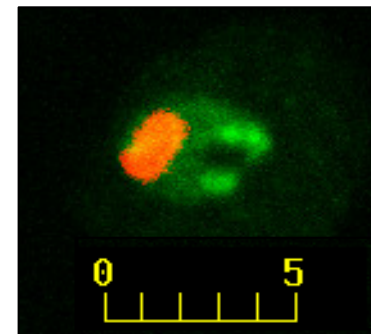
--> inhibiteurs PUISSANTS,
SELECTIFS, ACTIFS
IN VIVO, NON TOXIQUES...



Inhib. Protéases	+	-	+	-	+	-
O/N incub.	-	-	-	-	+	+



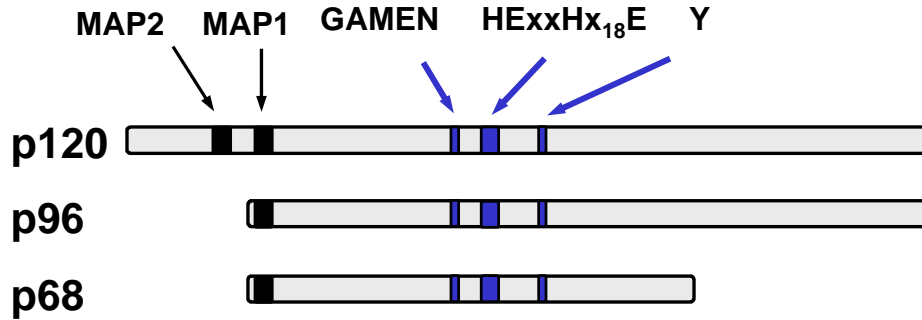
anti-MAP1
noyau



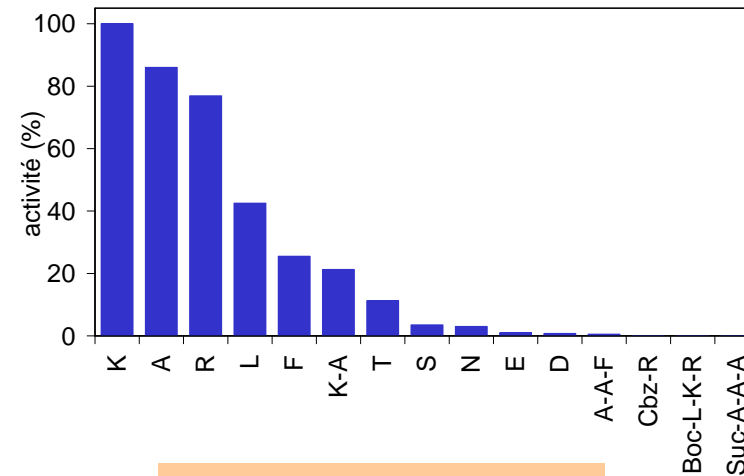
- Florent et al., 1998, *Mol. Biochem. Parasitol.* 97, 149-160
- Allary et al., 2002, *Parasitology*, 125, 1-10

PfA-M1 (FcB-1): Données biochimiques

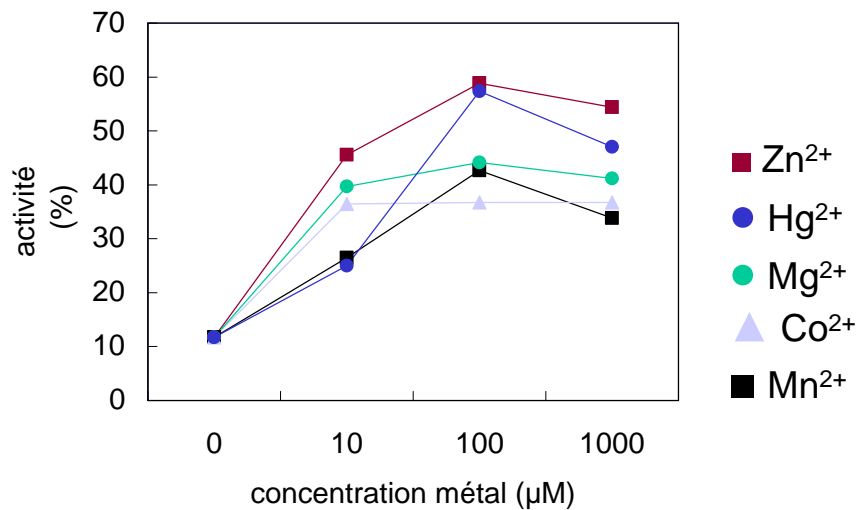
Aminopeptidase de 1085 aa



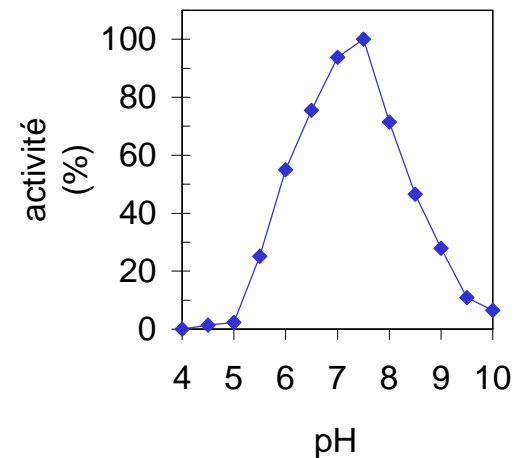
**Aminopeptidase stricte :
Clive les résidus basiques
et hydrophobes**



Réactivée par le Zinc



pH optimal neutre



PfA-M1 / MAL13P1.56 : Données de protéomique

Florens et al., (2002) : <i>P. falciparum</i>				
	Mrz	Tpz	Gmt	Spz
MAL13P1.56	49	43.9	20.5	18.2
Plasmepsin I	6.6	35.2	10	-
Plasmepsin II	21.2	43	11.5	-
Plasmepsin III (HAP)	14.2	52.8	29.9	-
Plasmepsin IV	-	-	8.4	-
Falcipain-1	-	-	-	2.5
Falcipain-2	-	27.5	-	-
Falcipain-3	-	15.4	3.9	-
Falcilysine	+	+	+	+

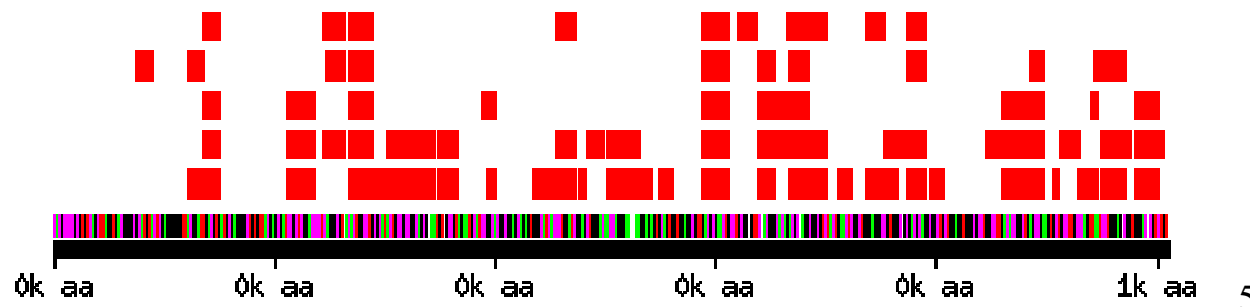
En % de couverture de la proteine

Hall et al., (2005) : orthologues murins				
	Gmt	Okn	Ocy	Spz
~MAL13P1.56	+	+		
~Plasmepsin IV	+	+		
~Falcipain-1	+			
~Falcipain-2	+	+		
~Falcilysine	+	+	+	+



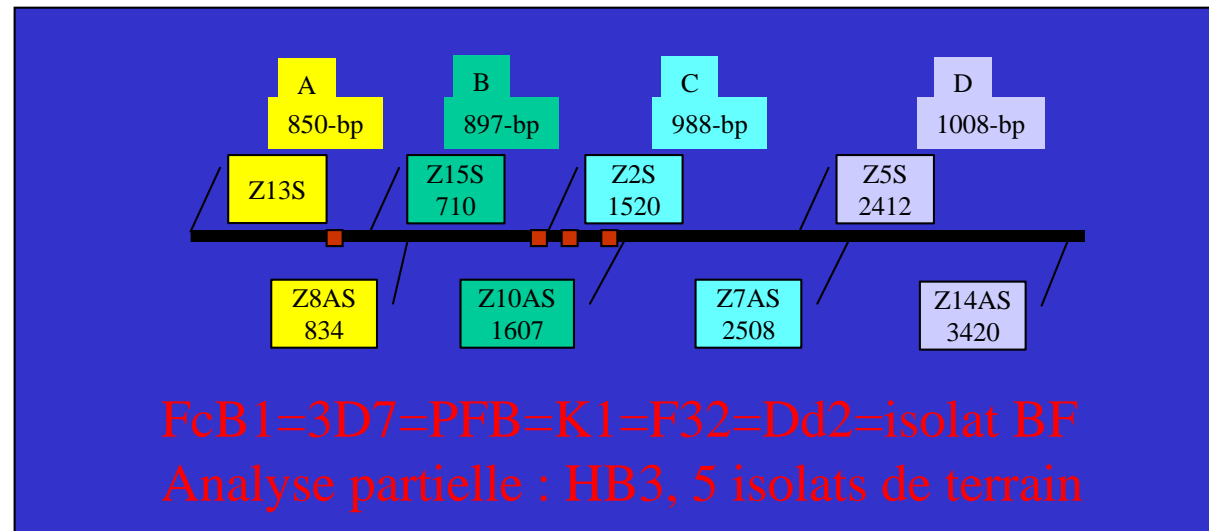
Pas un rôle exclusivement d'hémoglobinasase ?

MS IRBCMEMBRANE
 MS SPOROZOITE
 MS GAMETOCYTE
 MS TROPHOZOITE
 MS MEROZOITE
 AA sequence
 PF MAL13P1.56



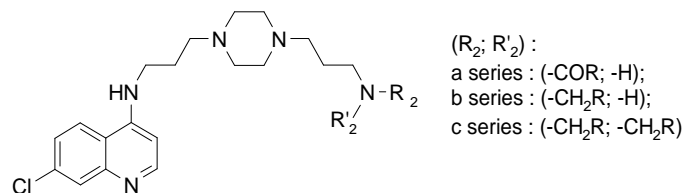
Pourquoi développer des inhibiteurs spécifiques de PfA-M1 ?

- Métalloprotéase
- Gène en copie unique, à priori non polymorphe



- besoin d'outils pour étudier spécifiquement PfA-M1
NB : bestatine : $K_i = 25\text{nM}$ sur PfA-M1
- PfA-M1 isolée par affinité au cours de l'analyse d'une nouvelle série d'antipaludiques

Criblage d'analogues de la CQ basés sur le motif 1,4 bis (3aminopropyl) piperazine *



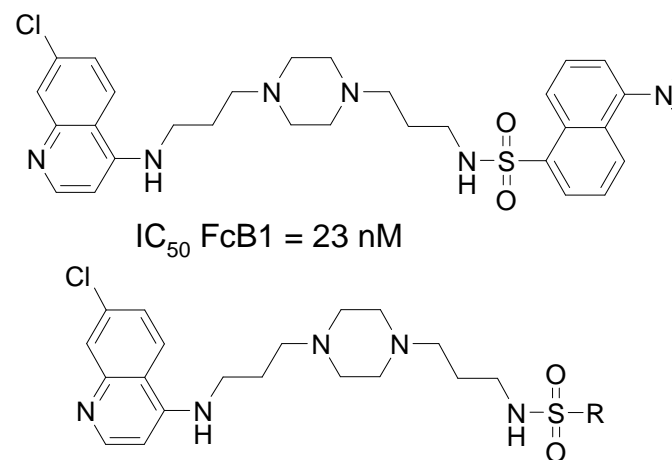
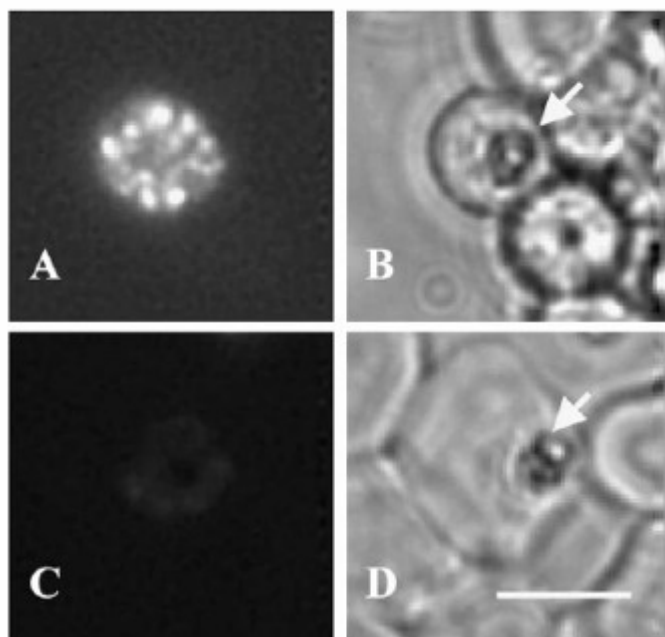
#	R group	IC ₅₀ Parasite growth <i>FcB1</i> strain (nM)	IC ₅₀ β-hematin formation (μM)	VAR (*10 ³)	IC ₅₀ MRC5
CQ ^a	-	126.0	77	54	50M
1a	3-phenoxyphenyl	20.8	79	30	5μM
2a	4-nitrophenyl	12.2	36	28	3.9μM
3a	cyclopropyl	289.2	34	30	16μM
4a	propyl	73.4	40	30	16μM
1b	3-phenoxyphenyl	19.8	38	5625	1μM
2b	4-nitrophenyl	5.9	40	5572	-
3b	cyclopropyl	10.2	23	5747	16μM
4b	propyl	24.8	51	5747	16μM
1c	3-phenoxyphenyl	260.5	75	5319	4μM
2c	4-nitrophenyl	46.1	15	102	-
3c	cyclopropyl	8.8	27	6062	4μM
4c	propyl	7.5	7	5980	51μM

→ Hypothèse de l'existence d'un autre mode d'action sur un autre type de cible

VAR : accumulation vacuolaire de la molécule

* Ryckebusch, A. ; Deprez-Poulain, R. ; Maes, L. ; Debreu-Fontaine, M.-A.; Mouray, E. ; Grellier, P. ; Sergheraert, C. Synthesis and *in Vitro* and *in Vivo* Antimalarial Activity of N1-(7-Chloro-4-quinolyl)-1,4-bis(3-aminopropyl)piperazine Derivatives *J. Med. Chem* **2003**. 46. 542-557.

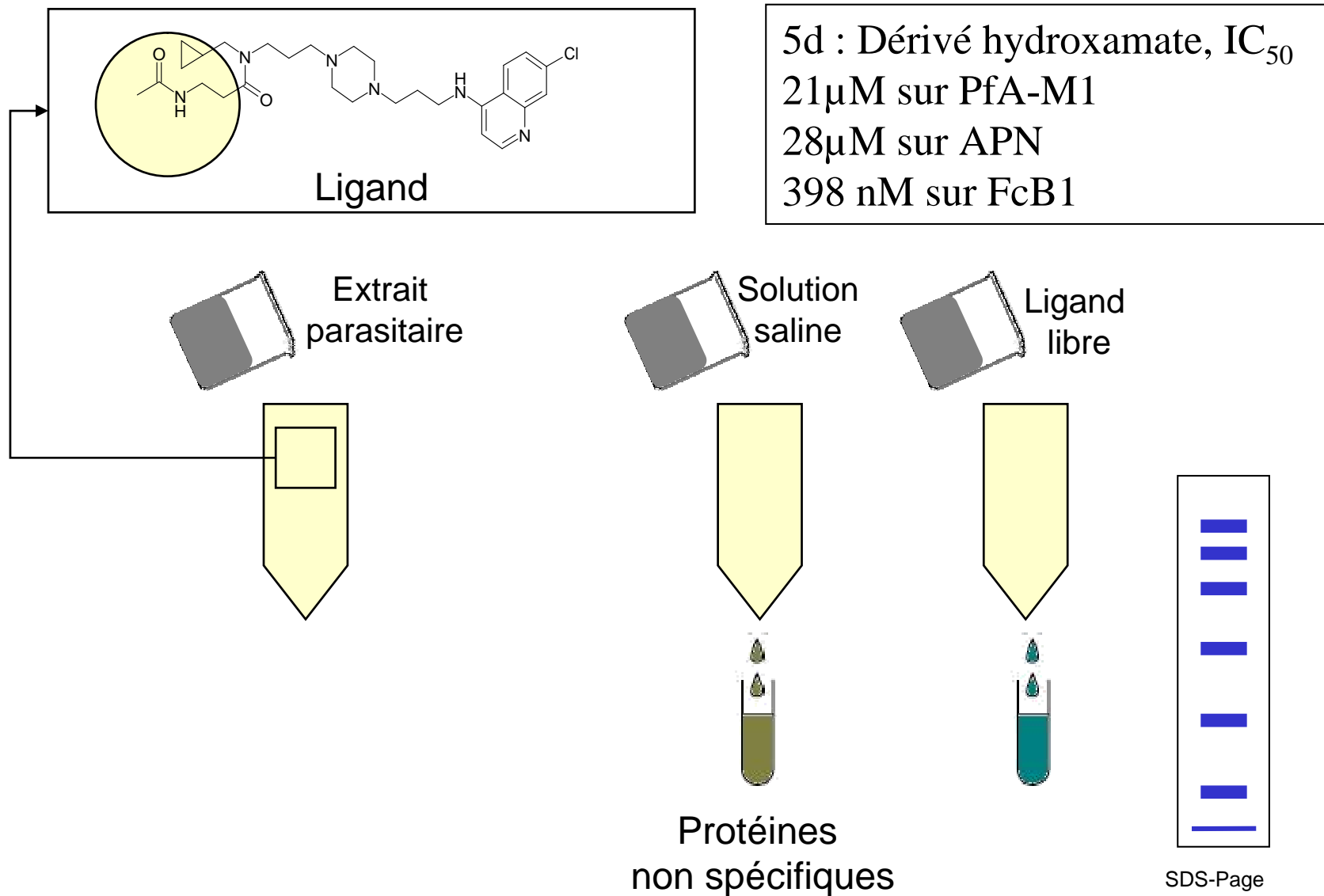
Localisation extra-vacuolaire d'analogues fluorescents de dérivés sulfonamides de cette série chimique *



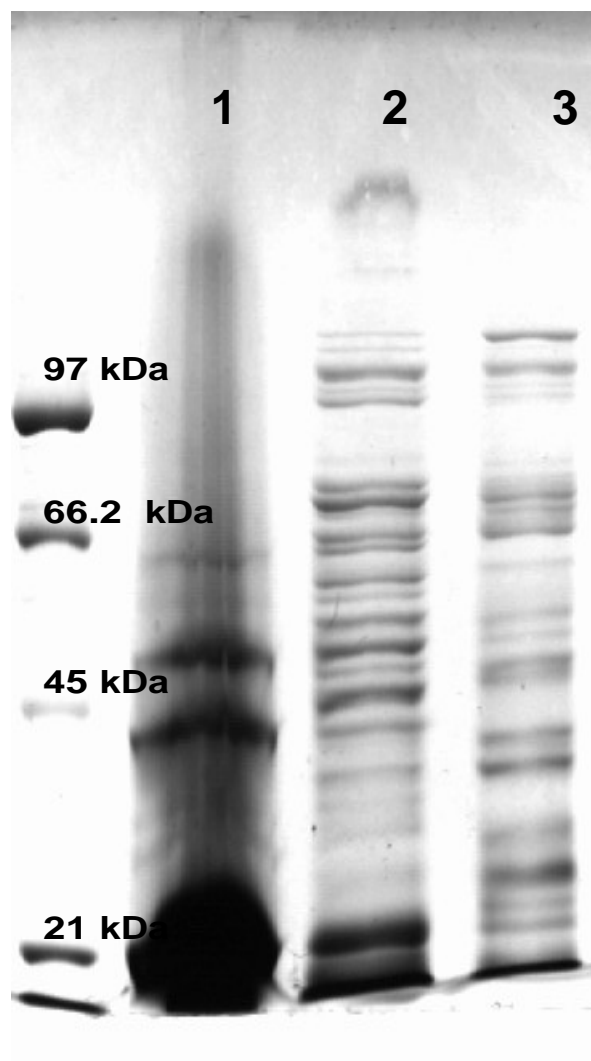
Cells were incubated 40 min in the presence of 2 mM compound 2 (A, B) or 2 mM compound 2 and 50 mM compound 5 (C, D). Compound 2 fluorescence was concentrated in structures of parasite cytoplasm. No Food vacuole (arrow) and uninfected erythrocyte labelling were observed (A). Competition experiment with compound 5 completely displaces the fluorescence of compound 2. B and D are corresponding phase images of A and C, respectively. Bar scale: 5 mm.

* Ryckebusch, A. ; Deprez-Poulain, R. ; Debreu-Fontaine, M.-A. ; Vandaele, R. ; Mouray, E. ; Grellier, P. ; Sergheraert, C. Parallel Synthesis and Anti-Malarial Activity of a Sulfonamide Library *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002** 12 2595–2598.

Approche par affinité : Greffage du produit 5d de la série sur une colonne d'affinité pour trouver des cibles potentielles



Analyse par électrophorèse puis spectrométrie de masse



N°	Nb peptides	% recouvrement	MW (kDa)	Protéine
1	34/63	35%	139.1	Falcilysin
2	23/41	28%	123.2	PfA-M1
3	9/80	18%	72.5	Heat shock protein
4	-	-	-	-
5	6/52	14%	66.1	Calcium -dependent protein kinase -3
6	9/39	21%	55.9	Protein disulfide isomerase
7	6/37	20%	53.3	Glutamate dehydrogenase (NADP+)
8	10/43	34%	45.4	Methionine adenosyltransferase
9	10/31	34%	40.55	Fructose -1,6-Biphosphate Aldolase
10	-	36%	34.4	L-Lactate dehydrogenase (LDH)
		10%	37.2	Glyceraldehyde-3-phosphate desh.
11	No match	-	35	Adenosine deaminase*
12	9/22	35%	34.4	LDH
13	7/43	27%	34.4	LDH
14	8/42	35%	26.1	Protein involved in gametocytogenesis

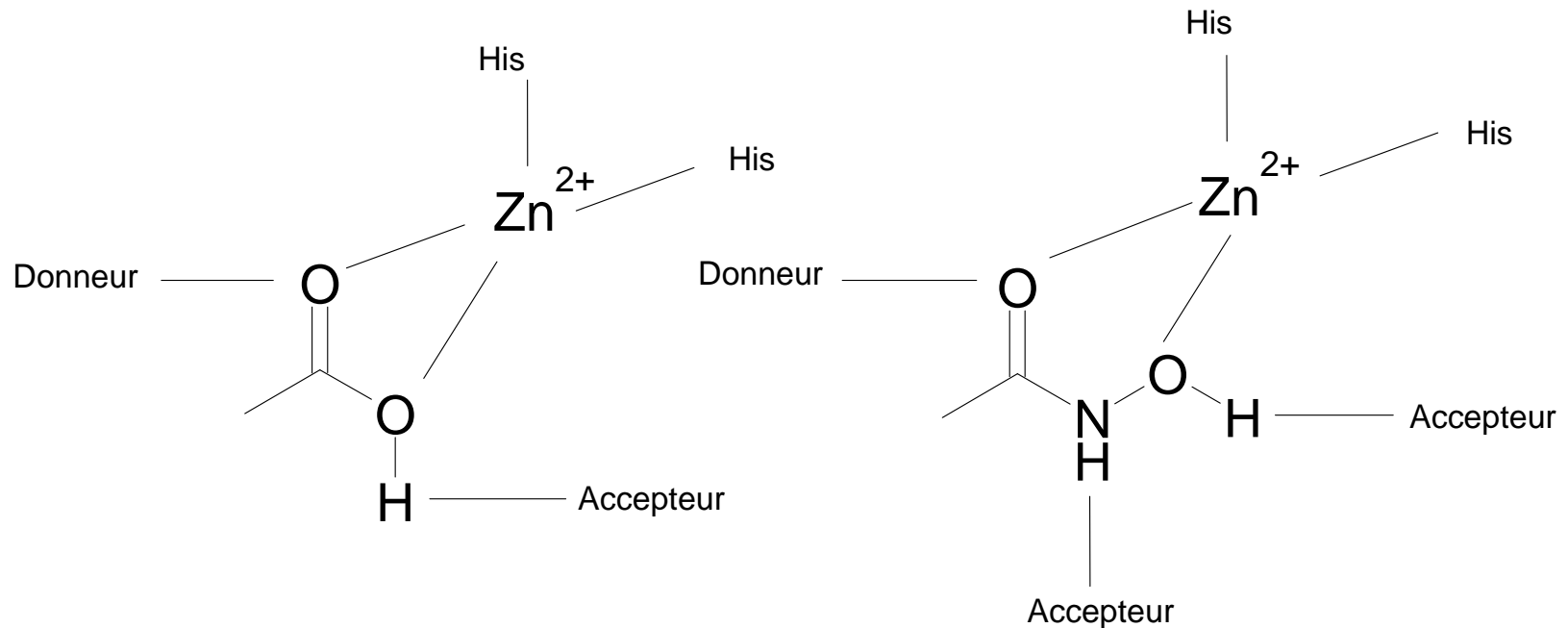
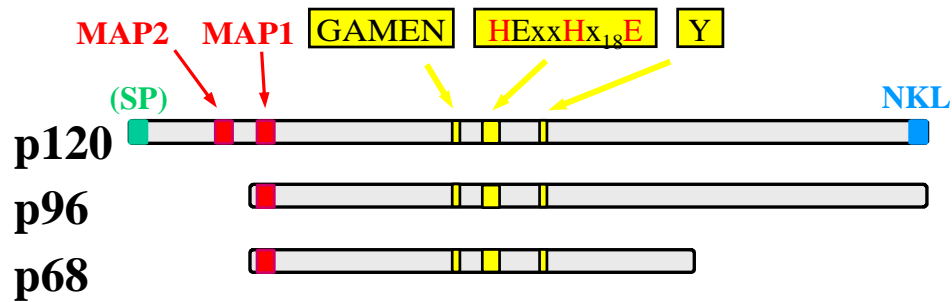
1: Elution 50 mM NaCl

2: Elution 500 mM NaCl

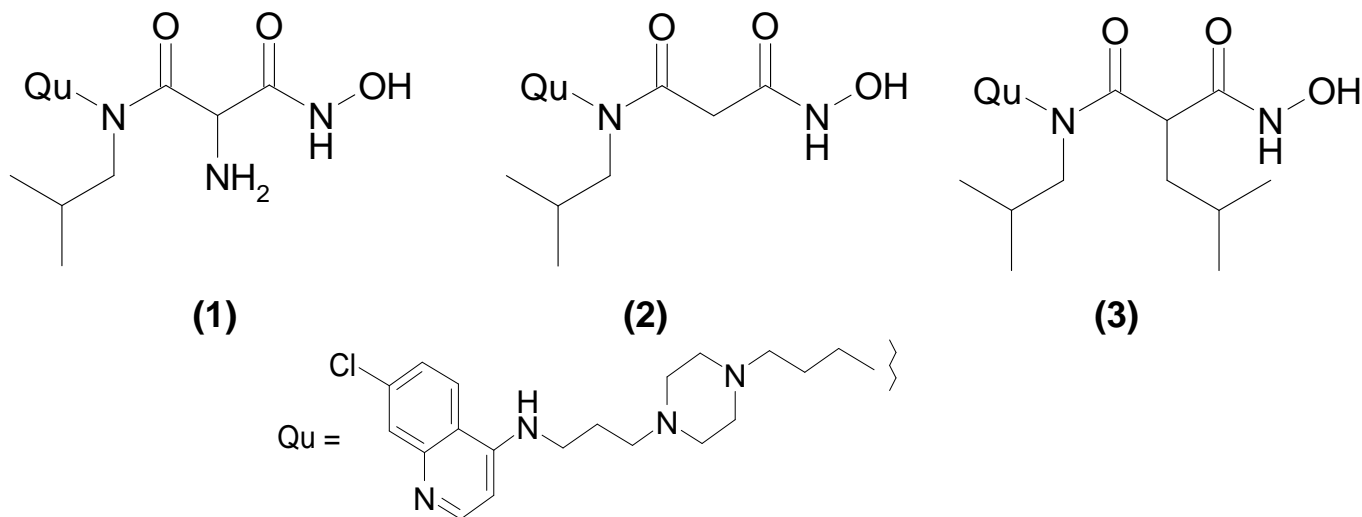
3: Compétition par le dérivé cyclopropyl 5 mM

* Séquençage N-terminal¹⁰

Choix d'une stratégie d'optimisation chimique pour PfA-M1 : introduction de **groupements chélatants du zinc** afin d'augmenter l'affinité à la cible



Première campagne de criblage : 45 composés*



	IC₅₀ de Pfa-M1 (native) (μM) ^a	IC₅₀ de AMPN de mammifère (native) (μM) ^b	IC₅₀ de la croissance parasitaire (μM) ^c
CQ	nd ^d	nd ^d	0,126
bestatine	0,28	2,7	29
reference	21	28	0,398
1	2,50	1,34	0,178
2	0,85	0,03	0,317
3	1,54	1,63	0,151

a : Substrat Leu-pNA; b : enzyme microsomale de rein de porc; c: Souche FcB1 (Colombie) ; d : non déterminé

* Flipo, M.; Florent, I.; Grellier, P.; Sergheraert, C.; Deprez-Poulain, R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 2659–2662.

Deuxième campagne de criblage :

**320 produits appartenant à 5 familles d'acides hydroxamiques
(chélatants du zinc)**

**1) Criblage des 320 produits à 10 μ M sur les deux enzymes
(substrats Leu-pNa, cinétiques sur 1h)**

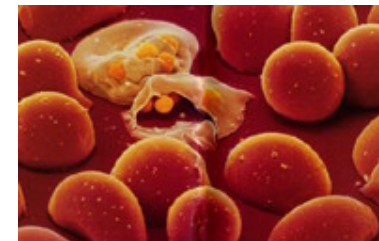
Pfa-M1					
Intervalles d'inhibition à 10 μ M	1	2	3	4	5
> 90%	3	22	16	2	0
90% > > 80%	9	9	9	0	0
80% > > 50%	27	25	27	2	6
50% > > 30%	13	28	9	6	9
30% >	45	16	39	91	84
Total	100	100	100	100	100

APMN					
Intervalles d'inhibition à 10 μ M	1	2	3	4	5
> 90%	30	2	9	2	0
90% > > 80%	17	28	11	3	2
80% > > 50%	22	50	31	14	13
50% > > 30%	16	14	16	16	27
30% >	16	6	33	66	59
Total	100	100	100	100	100

Deuxième campagne de criblage :

8 produits issus du criblage enzymologique

2) tests sur les parasites en culture asynchrones et synchrones (Trophozoites)



IC ₅₀	PfA-M1 (nM)	Apn (nM)	Parasites (μM) FcB1	Famille structurale	Tests sur parasites synchrones	T	S	R	T
MF/02/62	28	3600	45	3a	80 μM				
RDP/03/49	48	>>>10000	25	3	80 μM				
RDP/03/60-1	46	443	45	1	80 μM				
MF/02/71	51	1000	63	3	80 μM				
RDP/03/29	96	8620	56	1	80 μM				
RDP/03/25	2950	3000	50	1a	80 μM				
MF/02/66	1008	2130	45	3	80 μM				
RDP/03/44	>>>10000	2000	25	3	80 μM				
Bestatine	500	2700	4-6	-	20 μM				

CQ	125 nM				
E64	10 μM				
RPMI	-				

Biologie et Evolution des Protozoaires
Département RDDM : Régulations,
Développement, Diversité Moléculaire,
Muséum National d 'Histoire Naturelle,
Paris, France

Pr. Philippe GRELLIER

Pr. Joseph SCHREVEL

Dr. Christiane DEREGNAUCOURT

Dr. Isabelle FLORENT

Dr. Yves BOULARD

Dr. Marc Gèze

Dr. Marc DELLINGER

Dr. Elisabeth MOURAY

Zakia DERHY

Marina ALLARY

Sébastien CHARNEAU

Izabela BASTOS

Carole GUILLAUME

Pr. Jean-Bosco OUEDRAOGO
Odile HATO

IRSS-Centre Muraz,
Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

Dr. Rébecca DEPREZ-POULAIN
Marion FLIPO
Dr. Hervé DROBECQ

UMR CNRS 8525, Institut Pasteur
de Lille, Faculté de Pharmacie,
Lille

Programme PAL+ 2002