

PfA-M1 : une nouvelle cible thérapeutique dans la lutte contre le paludisme

Bérénice Chaillou, Germain Revelant, Sébastien Albrecht, Marjorie Schmitt, Isabelle Florent

Résumé Le paludisme est une maladie infectieuse due aux parasites du genre *Plasmodium*, qui entraîne encore aujourd'hui de nombreuses victimes dans les régions intertropicales d'Afrique, d'Amérique et d'Asie. Les traitements actuels rencontrent des problèmes de coûts élevés et de résistance, d'où la nécessité de développer de nouveaux traitements. Dans cet article, les auteurs s'intéressent à une nouvelle cible : la métallo-aminopeptidase PfA-M1. L'inhibition de cette aminopeptidase montre qu'elle est essentielle à la survie et à la croissance du parasite. La conception, la synthèse et l'évaluation biologique d'inhibiteurs de PfA-M1 de type aminobenzosubérone sont présentées.

Mots-clés Paludisme, *Plasmodium falciparum*, métalloaminopeptidase, PfA-M1, inhibiteurs, aminobenzosubérone.

Abstract **PfA-M1: a new therapeutical target against malaria** Malaria is an infectious disease due to *Plasmodium* parasites, still causing numerous deaths in intertropical areas of Africa, America and Asia. Existing treatments face problems of high cost and resistance, hence the need to develop new compounds. In this article, the authors are interested in a new target, PfA-M1 metallo-aminopeptidase. Inhibition of this aminopeptidase shows it is essential for parasite survival and growth. The design, synthesis and biological test of PfA-M1 inhibitors based on an aminobenzosuberone scaffold are described.

Keywords Malaria, *Plasmodium falciparum*, metalloaminopeptidase, PfA-M1, inhibitors, aminobenzosuberone.

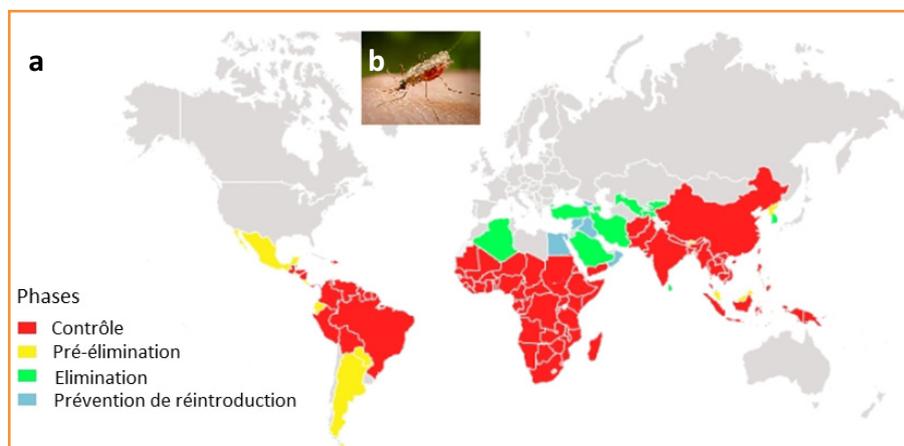
Le paludisme, un fléau mondial

Le paludisme reste aujourd'hui une maladie infectieuse préoccupante et mortelle à travers l'Afrique, l'Asie et l'Amérique. L'Organisation mondiale de la santé (OMS) estime qu'en 2013, 207 millions de personnes ont contracté la maladie et 627 000 personnes en sont décédées [1]. La grande majorité des victimes sont les enfants de moins de cinq ans et les femmes enceintes.

Le paludisme est endémique dans 104 pays, essentiellement situés dans les zones intertropicales d'Amérique, d'Asie et d'Afrique, qualifiées de « ceinture de pauvreté » (figure 1a). L'Afrique est de loin le continent le plus touché, avec 90 % des décès dans cette zone en 2013. Les conséquences de cette maladie entraînent de grandes difficultés économiques conduisant à une diminution du produit intérieur brut (PIB), pouvant atteindre - 1,3 % dans les pays où la transmission palustre est intense. Les familles et communautés se retrouvent alors dans une spirale de paupérisation.

Le paludisme est une maladie infectieuse due à des parasites du genre

Plasmodium transmis par des moustiques de type *Anopheles* (figure 1b). *Plasmodium* a un cycle complexe de reproduction orchestré alternativement chez ses deux hôtes, moustique et *Homo sapiens* selon trois grandes phases : la reproduction sexuée chez l'anophèle, suivie d'une phase hépatique chez l'Homme et du cycle érythrocytaire ou reproduction asexuée (figure 2). Il existe cinq espèces de *Plasmodium* pathogènes



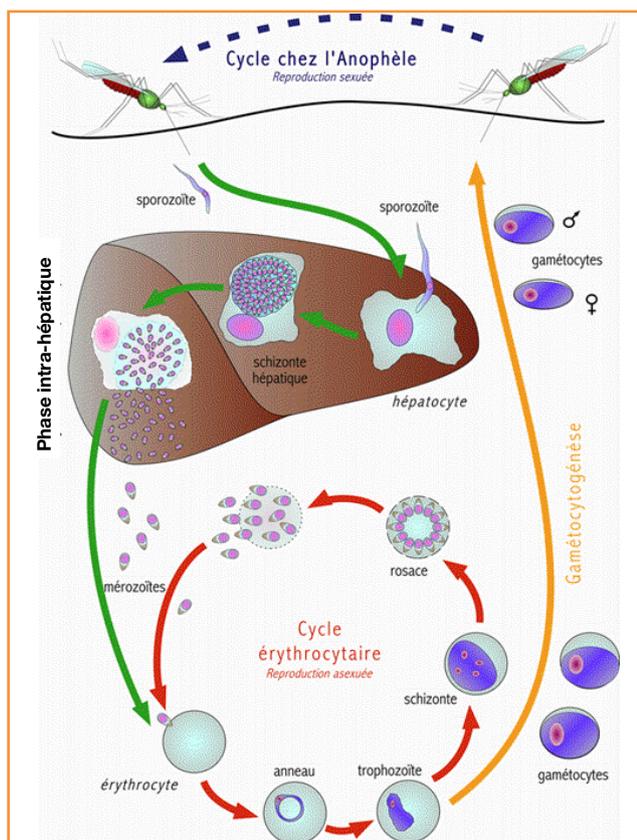


Figure 2 - Cycle de vie et de reproduction de *Plasmodium* [3].

chez l'Homme : *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* et *P. knowlesi*. Les *P. falciparum* et *P. vivax* sont les plus répandus et le *P. falciparum* est le plus mortel.

Les symptômes de l'infection apparaissent au bout de sept jours après la piqûre de moustique et se caractérisent par des épisodes fébriles aigus. Les premiers symptômes peuvent être modérés et difficiles à attribuer au paludisme, ce qui rend le diagnostic difficile. S'il n'est pas traité dans les 24 heures, le paludisme à *P. falciparum* peut évoluer vers une affection sévère, souvent mortelle chez les plus fragiles.

La lutte contre le paludisme

Il n'y a actuellement aucun vaccin homologué et les moyens existants pour lutter contre le paludisme sont la lutte directe contre les moustiques, appelée lutte antivectorielle, ainsi que les médicaments visant la reproduction du parasite chez l'Homme.

Dans le cadre de la lutte antivectorielle, l'OMS préconise l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticide pour toutes les populations exposées au risque d'infection, ainsi que la pulvérisation intradomiciliaire d'insecticides. Dans cette lutte, nous pouvons également citer des travaux cherchant à détruire le parasite directement chez l'anophèle [4].

L'arsenal thérapeutique chez l'Homme est quant à lui composé de trois classes principales de médicaments : les dérivés quinoléines, dont les plus connus sont la quinine et la chloroquine, les antifolates, et plus récemment les dérivés d'artémisinine (figure 3).

La situation reste cependant préoccupante car dans la plupart des régions du monde, le parasite a développé des processus de résistance, rendant plus ou moins inefficaces

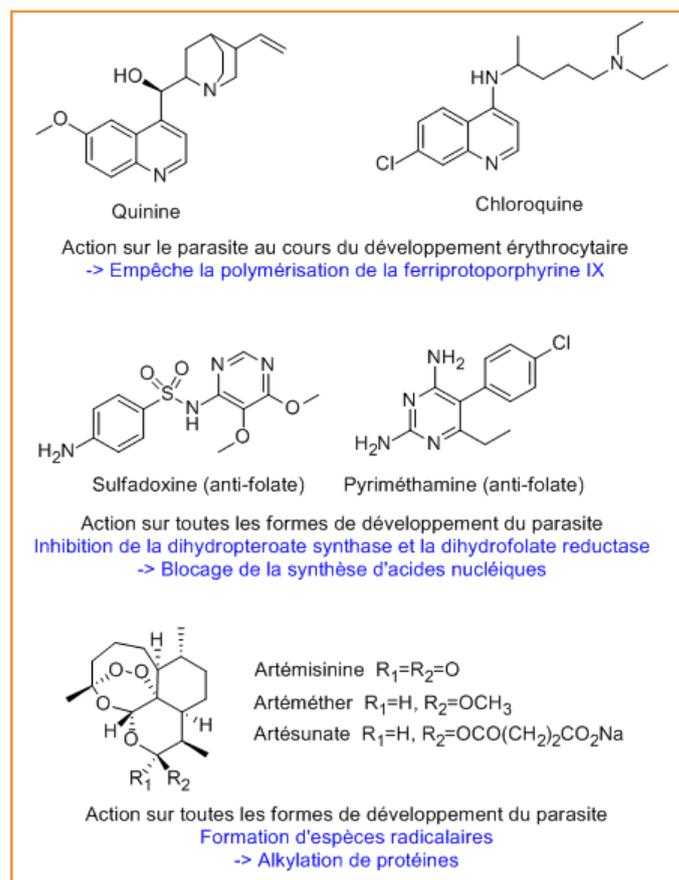


Figure 3 - Exemples représentatifs de composés antipaludiques.

les anciens traitements (quinine et chloroquine), vendus à bas prix. L'OMS préconise actuellement l'utilisation de combinaison médicamenteuse à base d'artémisinine en tant que traitement de première ligne contre le paludisme à *P. falciparum*. Ces dérivés d'artémisinine sont extrêmement efficaces, mais restent malheureusement coûteux pour les populations défavorisées et présentent des problèmes de neurotoxicité lors de prises à long terme [5]. De plus, des cas de résistance ont été identifiés dans quatre pays de la sous-région du Grand Mékong : Cambodge, Myanmar, Thaïlande et Viet Nam [1, 6].

Rien n'est acquis à ce jour, ce qui encourage fortement la communauté scientifique à la découverte d'alternatives aux options thérapeutiques existantes. L'identification de nouvelles cibles thérapeutiques est donc indispensable ; nous pouvons par exemple citer la N-myristoyltransférase (NMT), une enzyme essentielle à la survie et la propagation du parasite [7]. Par ailleurs, il est également important de concevoir de nouveaux composés peu coûteux et peu toxiques.

Vers de nouveaux traitements antipaludiques

Une nouvelle cible thérapeutique : PfA-M1

Récemment, l'aminopeptidase PfA-M1 (*Plasmodium falciparum* aminopeptidase de la famille M1) a émergé comme candidate potentielle pour la conception d'une nouvelle classe de médicaments antipaludéens [8-9]. Cette enzyme catalyse le clivage d'acides aminés d'un peptide/d'une protéine à l'extrémité N-terminale. PfA-M1 est une métallo-enzyme possédant dans son site actif un cofacteur métallique ion zinc,

Le cycle érythrocytaire de *Plasmodium*

Le cycle érythrocytaire correspond à l'invasion des érythrocytes par les parasites relargués par le foie infecté. Pour sa survie et sa croissance, le parasite catabolise jusqu'à 75 % des protéines des érythrocytes, dont majoritairement l'hémoglobine. La complémentarité des endopeptidases bien connues aujourd'hui (plasmepsine, falcipaine, falcylisine) et des exopeptidases dont *PfA-M1* fournit les acides aminés indispensables au métabolisme de ce dernier.

essentiel à la catalyse. Elle présente une large spécificité de substrats (acides aminés basiques, aromatiques et hydrophobes).

Cette aminopeptidase a un rôle essentiel lors du cycle érythrocytaire de *Plasmodium* [10-12]. Elle est impliquée dans la dernière étape du catabolisme de l'hémoglobine en assurant l'hydrolyse des dipeptides en acides aminés, indispensables au métabolisme du parasite (voir encadré).

D'après des données de protéomique, *PfA-M1* est exprimée à divers stades du cycle de vie du parasite (mérozoïte, trophozoïte, gamétoïte, sporozoïte et anneau) [13-14]. Ainsi, son rôle ne se limiterait pas à cette unique activité d'hémoglobinase mais son inhibition est létale pour le parasite. En effet, le blocage de son activité par des analogues de dipeptide (bestatine, figure 4) empêche la croissance de *P. falciparum* (souche sauvage et souche résistante à la chloroquine) en culture et réduit de 92 % la parasitémie dans un modèle murin d'infection à *P. chabaudi chabaudi* sans sérieuse toxicité [9, 12, 14-16].

Conception d'inhibiteurs puissants et sélectifs de *PfA-M1*

PfA-M1 possède dans son site actif un ion zinc essentiel à la catalyse. Parmi les inhibiteurs de *PfA-M1* décrits à ce jour, une première classe se compose, de façon classique, d'un

groupe chélatant le métal dans une structure de type peptidique, comme les acides hydroxamiques, peu sélectifs (figure 4). Des analogues de l'intermédiaire tétraédrique de l'état de transition ont également été développés, i.e. des acides phosphiniques et des analogues de bestatine [16-19]. Ces inhibiteurs présentent l'inconvénient d'être peu sélectifs de la famille M1. Bien que des activités d'inhibition de l'ordre du nanomolaire soient observées *in vitro* sur cette enzyme, la croissance du parasite n'est inhibée qu'à des concentrations mille fois plus élevées, ce qui peut être lié à la biodisponibilité et perméabilité des composés étudiés.

Ces dernières années, notre laboratoire a conçu et développé des inhibiteurs de l'APN/CD13 de mammifère, ectoenzyme ubiquitaire multifonctionnelle qui semble impliquée dans la régulation de peptides signaux, ainsi que dans les processus d'activation et de migration cellulaire [20]. Des composés de type aminobenzosubérone se sont avérés particulièrement puissants et sélectifs de l'APN/CD13, interagissant avec le cœur de la machinerie catalytique (figure 4) [21-23]. *PfA-M1* et l'APN/CD13 de mammifère appartiennent toutes deux à la famille M1 des aminopeptidases. Bien qu'elles ne présentent que 30 % d'homologie de séquence, elles ont un repliement similaire et les acides aminés catalytiques sont extrêmement conservés. En tenant compte des particularités structurales liées à l'espèce considérée, nous pouvons adapter ce châssis moléculaire à *PfA-M1*.

Afin de prédire l'orientation de ces composés dans le site actif de l'enzyme et de pouvoir ainsi guider la synthèse organique, nous avons mené des simulations de docking moléculaire pour le complexe *PfA-M1*-aminobenzosubérone **I** (figure 5) [24]. Ce modèle souligne l'interaction du substituant phényle **A** dans le sous-site S'_1 qui peut être modulé afin d'optimiser l'occupation de ce sous-site. Par ailleurs, nos molécules ne développeraient aucune interaction avec le sous-site S_1 de l'enzyme, indication qui peut être également exploitée (substitutions en position 9).

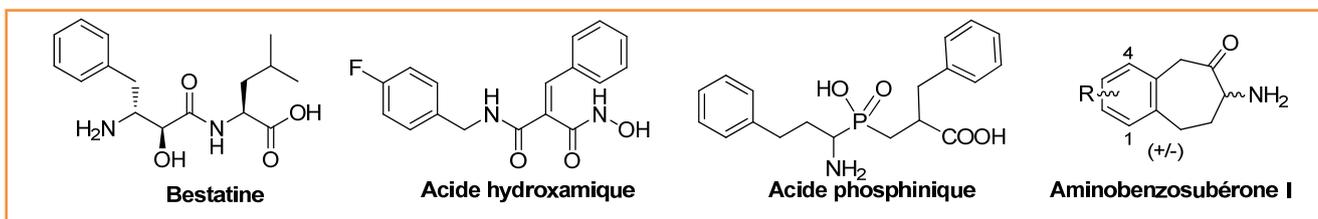


Figure 4 - Différentes classes d'inhibiteurs de *PfA-M1*.

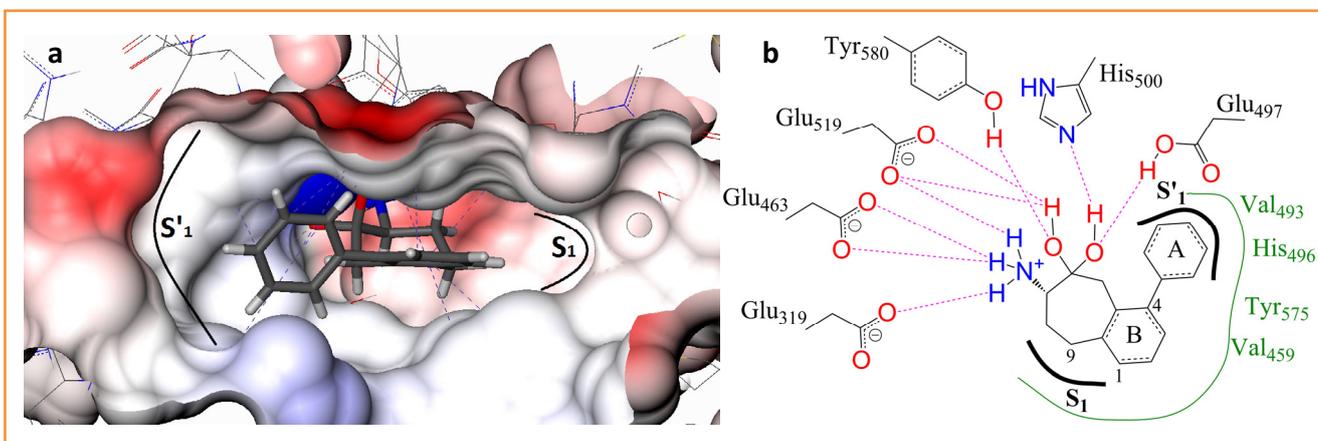
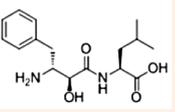
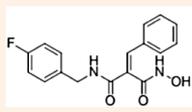
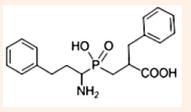
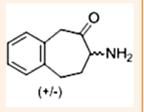
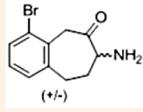
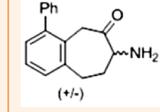


Figure 5 - a) Docking moléculaire d'un analogue aminobenzosubérone dans le site actif de *PfA-M1* (sphère bleue : ion zinc) obtenu à l'aide du programme FlexX du logiciel LeadIT 2.1.6 (BioSolveIT GmbH, Allemagne) ; b) mode de liaison proposé dans le site catalytique.

Tableau - Activités *in vitro* sur l'enzyme recombinante PfA-M1 et activités *in cellulo* (3D7 : souche sauvage ; FcB1 : souche résistante à la chloroquine).

						
K_i rPfA-M1 (μM)	0,478	0,006	0,079	-	1,5	0,4
IC₅₀ 3D7 (μM)	8-14	-	24-62	76	31	12
IC₅₀ FcB1 (μM)	10	24	-	56	22	4
Ratio IC₅₀/K_i	16-29	4 000	303-784	-	14	10
Réf.	[16]	[19]	[25]			

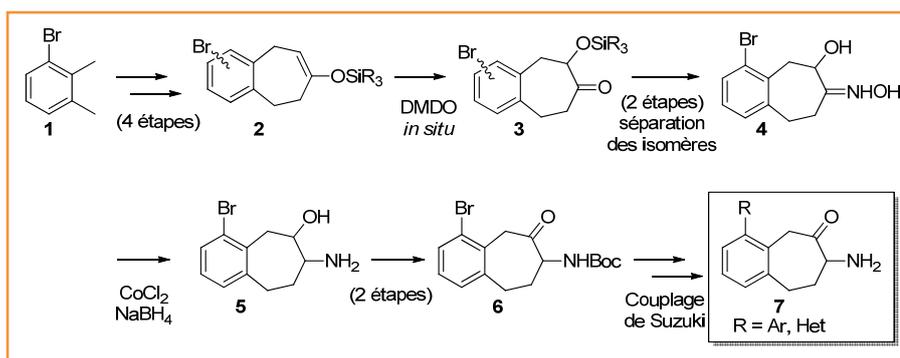


Figure 6 - Synthèse des analogues aminobenzosubérone ciblant PfA-M1.

La figure 6 illustre la voie de synthèse donnant accès à une variété d'analogues aminobenzosubérone substitués en position 4. L'intermédiaire clé silyloxy-cétone **3** est obtenu par oxydation de Rubottom de l'énol silylé **2**, lui-même synthétisé en quatre étapes à partir des produits commerciaux. Une séquence oximation/désilylation permet de former les deux isomères de l'oxime **4**, qui sont alors séparés par chromatographie. La réduction de l'oxime par le système NaBH₄/CoCl₂ est effectué sans déhalogénéation du cycle aromatique. La protection de l'amine et l'oxydation de l'alcool conduisent au composé **6**, qui peut être couplé à divers aromatiques via un couplage de Suzuki, puis déprotégé. Le couplage, réalisé à l'avant-dernière étape de la synthèse, permet de générer une grande diversité de composés.

Actuellement, de nouvelles voies de synthèse permettant de concevoir des composés favorisant les interactions avec le sous-site S₁ sont à l'étude dans le laboratoire.

Inhibition du développement de Plasmodium in cellulo

Les analogues aminobenzosubérone décrits précédemment ont été évalués *in vitro* sur l'enzyme recombinante PfA-M1⁽¹⁾ et *in cellulo* sur la croissance de *P. falciparum*. Quelques exemples représentatifs sont rapportés dans le tableau en comparaison avec les données de la littérature. Les relations structure-activité déterminées sont particulièrement encourageantes : plus l'inhibiteur est puissant sur l'enzyme, plus son activité antiparasitaire est intéressante. Nos composés inhibent la croissance du parasite et ont des activités *in cellulo* similaires aux composés de la littérature. Ils ont l'avantage de présenter une bonne pénétration cellulaire et parasitaire puisque le ratio entre l'activité *in vitro* et *in cellulo* n'est que de dix. De plus, ce châssis moléculaire offre de grandes

possibilités de modification et donc d'optimisation de l'affinité pour PfA-M1. D'autres analogues aminobenzosubérone sont en cours de synthèse et laissent penser qu'une amélioration de l'activité *in vitro* conduira à une amélioration de l'activité *in cellulo*.

Conclusion

Notre laboratoire conçoit et développe des inhibiteurs particulièrement spécifiques des aminopeptidases de la famille M1. Ces composés inhibent la croissance du parasite avec des IC₅₀ de l'ordre du micromolaire en corrélation très étroite avec l'inhibition de PfA-M1. Nous avons montré que ce châssis moléculaire offre une bonne pénétration cellulaire et parasitaire, signifiant que des composés de cette famille encore plus puissants *in vitro* vont permettre de diminuer fortement les concentrations effectives sur le parasite, en accord avec le développement actuel de nouveaux analogues au sein de notre laboratoire. Ce sont également d'importants outils biologiques qui vont permettre de parfaire notre connaissance sur le rôle de PfA-M1 dans les différents stades du cycle érythrocytaire et/ou du cycle complet de reproduction de *Plasmodium*.

Les auteurs remercient l'Agence Nationale pour la Recherche pour son soutien financier (ANR-12-BS07-0020-01), le Pr Céline Tarnus, porteur du projet ANR, Emmanuel Salomon, assistant ingénieur CNRS, pour sa participation au projet et l'Université de Haute Alsace pour la bourse de thèse MERT.

Note et références

- (1) La protéine recombinante rPfA-M1 a été produite et purifiée dans notre laboratoire. L'ADN génomique de *P. falciparum* PfA-M1, amplifié par PCR, a été inséré dans le vecteur pET45b (+). Le plasmide recombinant ainsi obtenu a été transformé dans *E. coli* Rosetta2 (DE3).
- [1] World Malaria Report, 2013, World Health Organization.
- [2] www.worldmaliareport.org (rubrique « GMP Map Gallery »), consulté le 24/04/2014.
- [3] http://ebischoff.free.fr/Palu/palu.html (rubrique « Qu'est ce que le paludisme ? »), consulté le 24/04/2014.
- [4] Wang S., Ghosh A.K., Bongio N., Stebbings K.A., Lampe D.J., Jacobs-Loren M., Fighting malaria with engineered symbiotic bacteria from vector mosquitoes, *PNAS*, 2012, 109, p. 12734.
- [5] Li Q., Hickman M., Toxicokinetic and toxicodynamic (TK/TD) evaluation to determine and predict the neurotoxicity of artemisinins, *Toxicology*, 2011, 279, p. 1.
- [6] Arey F. et al., A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria, *Nature*, 2014, 505, p. 50.
- [7] Wright M.H. et al., Validation of N-myristoyltransferase as an antimalarial drug target using an integrated chemical biology approach, *Nat. Chem.*, 2014, 6, p. 112.

- [8] Rawlings N.D., Salvesen G., *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 3rd ed., Academic Press, Elsevier, **2013**, p. 445-448.
- [9] Skinner-Adams T.S. *et al.*, *Plasmodium falciparum* neutral aminopeptidases: new targets for anti-malarials, *Trends Biochem. Sci.*, **2010**, *35*, p. 53.
- [10] Ragheb D., Dalal S., Bompiani K.M., Ray W.K., Klemba M., Distribution and biochemical properties of an M1-family aminopeptidase in *Plasmodium falciparum* indicate a role in vacuolar hemoglobin catabolism, *J. Biol. Chem.*, **2011**, *286*, p. 27255.
- [11] Dalal S., Klemba M., Roles for two aminopeptidases in vacuolar hemoglobin catabolism in *Plasmodium falciparum*, *J. Biol. Chem.*, **2007**, *282*, p. 35978.
- [12] Harbut M.B. *et al.*, Bestatin-based chemical biology strategy reveals distinct roles for malaria M1- and M17-family aminopeptidases, *PNAS*, **2011**, *108*, p. 526.
- [13] Azimzadeh O., Sow C., Gèze M., Nyalwidhe J., Florent I., *Plasmodium falciparum* PFA-M1 aminopeptidase is trafficked via the parasitophorous vacuole and marginally delivered to the food vacuole, *Malaria J.*, **2010**, *9*, p. 189.
- [14] Lasonder E. *et al.*, Proteomic profiling of *Plasmodium* sporozoite maturation identifies new proteins essential for parasite development and infectivity, *PLoS Pathog.*, **2008**, *4(10)*:e1000195.
- [15] Nankya-Kitaka M.F., Curley G.P., Gavigan C.S., Bell A., Dalton J.P., *Plasmodium chabaudi chabaudi* and *P. falciparum*: inhibition of aminopeptidase and parasite growth by bestatin and nitrobestatin, *Parasitol. Res.*, **1998**, *84*, p. 552.
- [16] McGowan S. *et al.*, Structural basis for the inhibition of the essential *Plasmodium falciparum* M1 neutral aminopeptidase, *PNAS*, **2009**, *106*, p. 2537.
- [17] Chan W.W.-C., Dennis P., Demmer W., Brand K., Inhibition of leucine aminopeptidase by amino acid hydroxamates, *J. Biol. Chem.*, **1982**, *257*, p. 7955.
- [18] Wilkes S.H., Prescott J.M., The slow, tight binding of bestatin and amastatin to aminopeptidases, *J. Biol. Chem.*, **1985**, *260*, p. 13154.
- [19] Flipo M., Beghyn T., Leroux V., Florent I., Deprez B.P., Deprez-Poulain R.F., Novel selective inhibitors of the zinc plasmoidal aminopeptidase Pfa-M1 as potential antimalarial agents, *J. Med. Chem.*, **2007**, *50*, p. 1322.
- [20] Mina-Osorio P., The moonlighting enzyme CD13: old and new functions to target, *Trends Mol. Med.*, **2008**, *14*, p. 361.
- [21] Al-Lakkis-Wehbe M., Chaillou B., Defoin A., Albrecht S., Tarnus C., Synthesis of amino-hydroxy-benzocycloheptenones as potent, selective, non-peptidic dinuclear zinc metalloaminopeptidase inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.*, **2013**, *21*, p. 6447.
- [22] Albrecht S., Al-Lakkis-Wehbe M., Orsini A., Defoin A., Pale P., Salomon E., Tarnus C., Weibel J.-M., Amino-benzosuberone: a novel warhead for selective inhibition of human aminopeptidase-N/CD13, *Bioorg. Med. Chem.*, **2011**, *19*, p. 1434.
- [23] Maieareanu C., Schmitt C., Faux N., Sir G., Le Nouën D., Defoin A., Tarnus C., A novel amino-benzosuberone derivative is a picomolar inhibitor of mammalian aminopeptidase N/CD13, *Bioorg. Med. Chem.*, **2011**, *19*, p. 5716.
- [24] Schechter I., Berger A., On the size of the active site in proteases. I. Papain, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1967**, *27*, p. 157.
- [25] Grembecka J., Mucha A., Cierpicki T., Kafarski P., The most potent organophosphorus inhibitors of leucine aminopeptidase. Structure-based design, chemistry, and activity, *J. Med. Chem.*, **2003**, *46*, p. 2641.



B. Chaillou

Bérénice Chaillou est doctorante, **Germain Revelant**, post-doctorant, **Sébastien Albrecht** (auteur correspondant), maître de conférences, à l'Université de Haute-Alsace¹.

Marjorie Schmitt est chargée de recherche à l'ECPM, Université de Strasbourg².

Isabelle Florent est professeur, Unité « Molécules de communication et adaptation des micro-organismes (MCAM), CNRS/MNHN³.

¹ Laboratoire de Chimie Organique et Bioorganique, EA4566, Université de Haute Alsace-ENSCMu, 3 rue Alfred Werner, F-68093 Mulhouse Cedex.

Courriels : berenice.chaillou@uha.fr ; germain.revelant@uha.fr ; sebastien.albrecht@uha.fr

² Université de Strasbourg, ECPM, Laboratoire de Chimie Moléculaire, CNRS UMR 7509, 25 rue Becquerel, F-67087 Strasbourg Cedex 2.

Courriel : marjorie.schmitt@uha.fr

³ CNRS/MNHN, UMR 7245 MCAM, F-75231 Paris.

Courriel : florent@mnhn.fr

Laboratoire de Synthèse et Fonctionnalisation des Céramiques



Le LSFC est une Unité Mixte de Recherche CNRS - Saint-Gobain basée sur le site du Centre de Recherches et d'Etudes Européen de Saint-Gobain, à Cavaillon (84).



Nos thématiques de recherche concernent les matériaux céramiques fonctionnels :

- Génération de structures poreuses hiérarchiques dans les matériaux.
- Contrôle de la microstructure des matériaux céramiques à l'échelle du grain pour optimiser leurs propriétés fonctionnelles (en particulier conduction ionique et électronique).
- Compréhension des interactions entre la surface des matériaux céramiques conducteurs et les espèces gazeuses réactives.

Nous participons à plusieurs projets collaboratifs nationaux et internationaux dans les domaines de l'énergie et de l'environnement.

Le laboratoire accueille de nombreux étudiants en stage, en thèse et en post-doctorat.

LSFC
Saint-Gobain CREE
550 av A. Jauffret
84306 Cavaillon

Directrice : Caroline Tardivat
caroline.tardivat@saint-gobain.com
+33 (0) 4 32 50 03 13
<http://lsfc.cnrs-mrs.fr>