UNIVERSITÉ FRANÇOIS – RABELAIS DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE SSBCV

I.S.P. Infectiologie et Santé Publique

THÈSE présentée par :

Simon GRAS

soutenue le : **06 décembre 2013**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François – Rabelais de Tours**

Discipline/ Spécialité : Science de la vie

Caractérisation des aminopeptidases N du parasite *Eimeria tenella* et implication en tant que cibles thérapeutiques de nouvelle génération pour lutter contre les coccidioses aviaires

THÈSE dirigée par :

Anne SILVESTRE	HDR, Chargée de Recherche, INRA Val de Loire
Co-encadrant :	
Fabien BROSSIER	Chargé de Recherche, INRA Val de Loire

RAPPORTEURS :

Isabelle FLORENT	Professeur, MNHN, Paris
Maryse LEBRUN	Directeur de recherche, INSERM, Montpellier

JURY :

Pascal BOIREAU	Directeur de recherche, ANSES
Isabelle DIMIER-POISSON	Professeur, Université François-Rabelais, Tours
Isabelle FLORENT	Professeur, MNHN, Paris
Gilles LALMANACH	Professeur, Université François-Rabelais, Tours
Maryse LEBRUN	Directeur de recherche, INSERM, Montpellier
Anne SILVESTRE	HDR, Chargée de Recherche, INRA Val de Loire

All in due time, see the world through different eyes
All in due time, shadows will give way to light
All that we suffer through leads to determination
The trials we all go through give us the strength to carry on
Something within us burns, desire feeds the will to live
A reason to believe I will see redemption

Killswitch Engage
In Due Time, *Disarm the descent*, 2013

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Fabien Brossier, directeur de l'équipe Pathogenèse des coccidioses. Merci de m'avoir accueilli et encadré pendant ces trois années et ce même quand les conditions ne t'étaient pas favorables. Merci d'avoir toujours été juste, critique, disponible et ouvert à la discussion. Je remercie également profondément le reste de l'équipe Anne Silvestre, Alisson Niepceron, Françoise Bussiere, Laura Sedano et Laurence Silpa. Merci pour tout le soutien scientifique et moral que vous m'avez fourni tout au long de ces trois années. Ne changez rien à votre manière d'être. Travailler au quotidien avec toute l'équipe a vraiment été un grand plaisir.

Je remercie également l'ensemble des membres de mon jury de thèse : les Professeurs Isabelle Dimier-Poisson, Isabelle Florent et Gilles Lalmanach, ainsi que le Directeur de recherche Pascal Boireau et la Directrice de recherche Maryse Lebrun. Merci à Isabelle Florent et Maryse Lebrun d'avoir accepté, en plus, d'être mes rapporteurs et à Isabelle Dimier-Poisson d'avoir bien voulu présider mon jury.

Merci Thierry Pineau et Dominique Buzoni-Gatel pour avoir accepté ma demande de prolongation de thèse et ainsi permis de préparer ce manuscrit dans les meilleures conditions possibles. Je remercie également la Région Centre et l'INRA d'avoir financé ma thèse.

Je remercie toutes les personnes avec qui j'ai travaillé, Florence B. Gilbert, Anna Byzia, Sheena McGowan, Marcin Drag, Henri Vial, Cécile Enguehard-Gueiffier, Mohamed Abarbri, Julien Pétrignet, Julien Gaillard, Sébastien Lavillate, Olivier Dubes et Laurence Mérat. Merci d'avoir participé à l'avancée de mes travaux de recherche, pour votre disponibilité et réactivité. Je tiens à ce titre à remercier tout particulièrement Fabien Lecaille et Gilles Lalmanach pour leurs conseils avisés et leur aide ayant permis à un certain nombre de ces collaborations d'avoir lieu.

Merci à Jean-Christophe Barale, Patricia Baldacci et Fabien Lecaille d'avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse, pour leurs conseils avisés et leurs encouragements.

Je remercie également Fabrice Laurent, Sonia Lamande, Muriel Naciri, Catherine Shouler, Nathalie Chanteloup, Alexandra Blanchard et Jean-François Vautherot pour leur disponibilité et leurs conseils quand j'ai eu besoin de leurs expertises.

Je remercie également Virginie Cuvillier-Hot, Aurélie Tasiemski, Isabelle Fournier, Michel Salzet, qui m'ont fourni l'opportunité de réaliser mon Master 2. Merci à Virginie de m'avoir encadré durant le stage de Master 2 et de m'avoir appris les notions de rigueur scientifique et de précision ainsi que toutes les bases des manipulations biochimiques qui m'ont été si utile pendant ces trois années.

Merci à tous les autres doctorants Aurore, Louis, Robin, Laurence, Caroline, Nicolas, Gaëlle, William, Mathilde, Djihad, Perrine, Louise, pour leur aide et pour les soirées passées ensemble. Je tiens également à remercie Mario, avec qui j'ai passé de très bons moments, notamment pendant ces trois éditions du Hellfest que nous avons vu ensemble.

Je remercie tout particulièrement Laëtitia Gras-Hoy, qui m'a suivi en région Centre pour que je puisse réaliser ma thèse. Merci à elle de m'avoir toujours soutenu, d'avoir supporté mon humeur et de m'avoir réconforté dans mes moments difficiles. Merci infiniment d'avoir accepté de devenir ma femme et de m'avoir donné une si belle fille, notre trésor, Ambre. Merci pour ta présence et ton amour qui m'ont donné la force d'être toujours à mon maximum au cours de ces trois ans de thèse.

Je remercie également nos deux familles et nos amis restés sur Lille, qui nous ont soutenu tout au long de ces trois ans et qui ont su répondre présent dans les moments importants de notre vie, et ce en dépit des kilomètres qui nous séparent.

Finalement, je remercie toutes les personnes qui s'intéresseront à mes travaux et à cette thèse ; la valeur d'un travail scientifique ne se mesurant au final que par son utilité à la communauté scientifique.

Simon.

Résumé

Les parasites du genre *Eimeria* sont des parasites apicomplexes provoquant des maladies graves, appelées coccidioses. Les coccidioses engendrent des pertes économiques importantes dans le monde, principalement dans les élevages aviaires. La contamination se fait par l'ingestion d'oocystes sporulés présents dans l'environnement. La multiplication a lieu dans les cellules du tractus digestif du poulet et les parasites sont disséminés dans les litières avec les déjections. Les symptômes associés à ces maladies sont, une morbidité importante, des altérations de la production, des diarrhées sanglantes et une mortalité pour les cas sévères. Deux moyens de lutte sont mis en œuvre dans les élevages : les vaccins qui sont onéreux et les traitements anticoccidiens, qui sont administrés dans l'alimentation dès l'éclosion du poussin. Depuis 50 ans, l'utilisation massive de ces molécules s'accompagne de l'émergence de populations parasitaires résistantes. Les modes d'action des cibles parasitaires des anticoccidiens étant mal connus, il est difficile de mettre en place une stratégie de contournement de la résistance. Identifier de nouvelles cibles thérapeutiques est une alternative possible afin de pouvoir continuer à lutter efficacement contre la coccidiose. Les protéases sont des cibles de choix dans le traitement de nombreuses maladies humaines tels que le cancer, le VIH ou des maladies parasitaires.

Les protéases sont des enzymes impliquées dans des processus parasitaires importants (invasion, développement, …) et de nombreux inhibiteurs de protéases sont testés dans le traitement des maladies parasitaires, tel que le K777 développé contre *Trypanosoma cruzi*. L'objectif de cette thèse est d'étudier le rôle des alanyl-aminopeptidase (aminopeptidases N) d'*E. tenella* et de déterminer si elles constituent de bonnes cibles thérapeutiques contre la coccidiose. Cette famille de protéases a été décrite chez *Plasmodium,* comme étant impliquée dans des processus clefs comme le métabolisme et le développement parasitaire. Des inhibiteurs dirigés contre *Pf*A-M1, l'aminopeptidase N de *Plasmodium falciparum,* sont efficaces en traitement *in vivo* de la malaria murine. Ces protéases constituent des cibles thérapeutiques potentielles contre la malaria. Ces données sont d'autant plus intéressantes que deux aminopeptidases N homologues à celles de *Plasmodium,* sont présentes dans le génome d'*E. tenella* et que des activités enzymatiques de type aminopeptidase ont été détectées dans des lysats parasitaires.

Nous avons caractérisé l'activité de type aminopeptidase détectée dans l'oocyste à l'aide du substrat fluorescent H-Ala-AMC. Lors de cette caractérisation, nous avons observé la présence d'*Et*-ApN1, l'une des deux alanyl-aminopeptidases décrites dans la littérature et

identifié une nouvelle alanyl-aminopeptidase que nous avons nommée *Et*-ApN3. Nous avons révélé l'existence d'une forte homologie entre *Et*-ApN1 d'*E. tenella* et *Pf*A-M1 de *Plasmodium falciparum* au niveau des séquences, des structures, des propriétés biochimiques, du clivage et de la localisation au cours du développement intracellulaire. L'ensemble des résultats obtenus suggère que, comme *Pf*A-M1, *Et*-ApN1 est impliquée dans le développement parasitaire et serait une cible thérapeutique potentielle. Pour valider cette hypothèse, nous avons travaillé avec des inhibiteurs de l'activité des aminopeptidases N. Après le crible d'une chimiothèque sur la base de la capacité des composés à inhiber les aminopeptidases N d'*E. tenella*, nous avons identifié le composé C36. Cet inhibiteur non cytotoxique qui interagit directement sur *Et*-ApN1 et inhibe son activité. Le composé C36 inhibe le développement *in vitro* d'*E. tenella*. L'activité inhibitrice du C36 est conservée pour deux autres parasites apicomplexes : les développements *in vitro* de *Toxoplasma gondii* et de *Plasmodium falciparum* sont aussi inhibés par le C36. Les perspectives de ces travaux de thèse seront la pharmaco-modulation du C36 afin d'améliorer sa solubilité et l'évaluation de son activité inhibitrice *in vivo*.

Summary

The parasite *Eimeria tenella* (*E. tenella*) belongs to the apicomplexa phylum and is one of the seven species responsible for avian coccidiosis. This disease is associated with a severe intestinal disorders leading to major economic losses in the world poultry industry. Contamination of chicken occurs with ingestion of sporulated oocysts present in the environment. Parasites invade and multiply in intestinal epithelial cells and are excreted from the intestinal lumen with bird droppings into the environment. Symptoms related to coccidiosis are morbidity, weight loss, decrease of food consumption, haemorrhagic diarrhea and mortality in most severe cases. The cost of vaccine and the emergence of anticoccidial drug resistances highlight the need of alternative strategies. For this purpose, identification of novel therapeutic targets is needed. Proteases play a fundamental role in many biological and pathological processes, and are targets in the treatment of various diseases such as cancer, HIV, or parasitic infection. Proteases are enzymes involved in various key processes of the life cycle of parasites. Several inhibitors have been tested for the treatment of parasitic diseases, such as the molecule K777 used against *Trypanosoma cruzi*. However, the role of proteases in *E. tenella* biological cycle is poorly defined.

The aim of this thesis is to identify the role of *E. tenella* aminopeptidases N and to evaluate their potency as therapeutic targets against coccidiosis. Neutral aminopeptidases are involved in *Plasmodium spp.* metabolism and the development. Inhibitors targeting *Plasmodium falciparum* neutral aminopeptidases are described as an emerging therapeutic solution against malaria. The presence of homologues of *Plasmodium* neutral aminopeptidases in *E. tenella* genome, 2 alanyl and 1 leucyl-aminopeptidase and aminopeptidase activities detected in *E. tenella* lysates suggest a role of aminopeptidases in *E. tenella* life cycle. In this work, we characterized two aminopeptidases present in the parasite *E. tenella*. First, aminopeptidases activities were detected in oocysts lysate using a fluoro-substrate, the H-Ala-AMC. Then, the presence of two aminopeptidases in *E. tenella* was identified: *Et*-ApN1, one of the two alanyl-aminopeptidases described in the literature and a novel aminopeptidase, that we named *Et*-ApN3. Strong homologies of sequence, structure, biochemical properties, cleavage pattern and localization between *E. tenella Et*-ApN1 and *P. falciparum Pf*A-M1 were shown. Taken together, these data suggest that, as its homologue *Pf*A-M1, *Et*-ApN1 is involved in parasite development and could be used as a potent therapeutic target. To test this hypothesis, we screened for inhibitors of *E. tenella* aminopeptidases N. By screening a small molecule library, we identified a novel compound,

C36. This compound inhibited *E. tenella* development *in vitro*. The inhibitory effect of C36 was also observed on the development of other apicomplexan parasites, such as *Toxoplasma gondii* and *P. falciparum*. However, more studies using a pharmaco-modulation approach are needed to improve the C36 chemical properties such as solubility, specificity and irreversibility. These new chemical molecules will then be tested *in vivo* on parasite development.

Table des matières

Remerciements 3
Résumé 5
Summary 7
Table des matières 9
Liste des tableaux 12
Liste des annexes 15
Liste des abréviations 16
Introduction 17
Synthèse bibliographique 19
A. Biologie du parasite 20
1. Classification et caractéristiques d'*Eimeria tenella*. 20
a. Impact des maladies parasitaires à l'échelle mondiale 20
b. Taxonomie 21
c. Les *Eimeria* de poulets 22
d. Cycle parasitaire 23
e. Caractéristique d'*E. tenella* 25
f. Les outils d'étude des *Eimeria spp.* 26
2. Coccidiose aviaire 27
a. Épidémiologie 27
b. Symptômes 27
c. Contrôle et moyens de lutte 28
d. Développement de méthodes alternatives 29
B. Les protéases 31
1. Généralités sur les protéases 31
a. Fonction 31
b. Classification 31
c. Aminopeptidases 32
d. Aminopeptidases N 33
2. Mécanismes d'action des protéases 34
a. Hydrolyse d'un substrat 34
b. Affinité, site catalytique et constante de Michaelis 35

c. Constante catalytique et constance de spécificité 36
d. Influence de l'environnement : pH, température, et cofacteurs 36
3. Mécanismes d'inhibition. 38
a. Inhibiteurs compétitifs, incompétitifs et non compétitifs 38
b. Inhibiteurs irréversibles 40
c. Inhibiteurs réversibles 40
d. Constante d'inhibition 40
4. Protéases parasitaires 41
a. Protéases facteurs de virulence 41
b. Protéases, cibles thérapeutiques potentielles 49
C. Utilisation d'inhibiteur de protéases comme antiparasitaire 52
a. Recherche et développement d'inhibiteurs 52
b. Utilisation en tant que traitement 53
c. Risques potentiels : Toxicité et résistance 57
Objectifs de la thèse 59
Résultats 68
Chapitre 1 : Caractérisation de la métallo-protéase *Et*-ApN1 69
a. Introduction 71
b. Matériels et méthodes 73
c. Résultats 81
d. Discussion et conclusion 93
Chapitre 2 : Identification d'une troisième aminopeptidase N d'*E. tenella* : *Et*-ApN3 97
a. Introduction 98
b. Matériels et méthodes 100
c. Résultats 106
d. Discussion et conclusion 114
Chapitre 3 : Caractérisation du C36, inhibiteur d'aminopeptidases et son effet sur le développement des parasites apicomplexes 117
a. Introduction 118
b. Matériels et méthodes 120
c. Résultats 129
d. Discussion et conclusion 138
Discussion générale et perspectives 140

Conclusion 149
Bibliographie 152
Annexes 178
Annexe 1 : Amorces 179
Annexe 2 : Activité du C36 sur *Toxoplasma gondii* 180
Annexe 3 : Dépôt de Brevet du composé C36 182
Annexe 4 : L'eimeripaïne, une protéase homologue de la cathepsine b, est exprimée pendant la sporulation du parasite apicomplexe *Eimeria tenella* 213
Annexe 5 : L'aminopeptidase N1 (*Et*-ApN1), une M1 métallo-protéase du parasite apicomplexe *Eimeria tenella,* participe au développement parasitaire 225

Liste des tableaux

Tableau 1 : Impact des principaux parasites à l'échelle mondiale 20
Tableau 2 : Comparaison de trois apicomplexes 22
Tableau 3 : Les aminopeptidases 33
Tableau 4 : Tableau non exhaustif des différentes protéases impliquées dans les processus clefs des cycles parasitaire 43
Tableau 5 : Tableau non exhaustif des effets de différents inhibiteurs sur les cycles de vie parasitaires 50
Tableau 6 : Tableau non exhaustif des inhibitions *in vivo* des cycles parasitaires par des inhibiteurs de protéases 51
Tableau 7 : Tableau des inhibiteurs de protéases commercialisés en 2005 55
Tableau 8 : Tableau non exhaustif des maladies impactées par les inhibiteurs de protéases utilisées dans le cadre du traitement contre le VIH 56
Tableau 9 : Spécificité enzymatique d'*Et*-ApN1$_r$ et *Pf*A-M1$_r$ sur les meilleurs substrats 89
Tableau 10 : Estimation des paramètres physico-chimiques des dérivés du C36 136

Liste des figures

Figure 1 : Photos des principaux parasites apicomplexes 20
Figure 2 : Classification des protozoaires 21
Figure 3 : Oocystes des sept espèces d'*Eimeria* 23
Figure 4 : Taille, localisation et périodes pré-patentes des espèces d'*Eimeria* aviaires ... 23
Figure 5 : Cycle biologique des *Eimeria* de poulet 24
Figure 6 : Ultrastructure d'*Eimeria tenella* 25
Figure 7 : Effets macroscopiques des coccidioses 28
Figure 8 : Les 3 catégories de protéases 32
Figure 9 : Hydrolyse d'un substrat AMC 34
Figure 10 : Enregistrement d'une activité protéolytique 35
Figure 11 : Représentation tridimensionnelle de l'interaction en la cathepsine K et un substrat 35
Figure 12 : Constante de Michaelis 36
Figure 13 : Influence du pH sur l'activité des protéases 37
Figure 14 : Influence de la température sur l'activité des protéases 37
Figure 15: Mode d'action des inhibiteurs compétitifs 38
Figure 16 : Mode d'action des inhibiteurs incompétitifs 39
Figure 17 : Mode d'action des inhibiteurs non-compétitifs 39
Figure 18 : Détermination du *Ki* d'un inhibiteur 40
Figure 19 : Implication de la gp63 dans l'adhérence cellulaire de *Leishmania spp.* 41
Figure 20 : Implication des protéases dans le métabolisme et le développement 44
Figure 21 : Implication des protéases dans l' « egress » de *P. falciparum* 46
Figure 22 : Implication des protéases dans l'immunomodulation des *Leishmania spp.* .. 48
Figure 23 Le K11777 inhibiteur de la cruzipaïne 52
Figure 24 : État de développement des inhibiteurs de protéases comme traitement des maladies humaines 54
Figure 25 : Résumé de la démarche scientifique suivie au cours de ma thèse 67
Figure 26 : La bestatine inhibe le développement d'*E. tenella* 81
Figure 27 : Une activité amino-protéasique est détectée dans un lysat d'oocystes 82
Figure 28 : Suivi de l'activité aminopeptidase et identification d'*Et*-ApN1 83
Figure 29 : Suivi de l'activité aminopeptidase pendant le fractionnement 84
Figure 30 : Comparaison des aminopeptidases N avec *Et*-ApN1 d'*E. tenella* 85

Figure 31 : Purification de *Et*-ApN1$_r$ 86
Figure 32 : Inhibition et restauration par des cations de l'activité d'*Et*-ApN1$_r$..... 87
Figure 33 : Comparaison des « fingerprinting » d'*Et*-ApN1$_r$ et *Pf*A-M1$_r$ 88
Figure 34 : Profil de transcription et d'expression d'*Et*-ApN1..... 90
Figure 35 : *Et*-ApN1 transite à travers le noyau du parasite pendant les phases précoces du développement..... 92
Figure 36 : Enregistrement d'une activité aminopeptidase dans un lysat de M2 106
Figure 37 : Profil d'activité en zymographie native pendant la sporulation et dans les M2 107
Figure 38 : Détection d'une troisième aminopeptidase N dans le génome d'*E. tenella* . 108
Figure 39 : Comparaison d'*Et*-ApN3 avec d'autres aminopeptidases N 109
Figure 40 : Profil de transcription et expression d'*Et*-ApN3 110
Figure 41 : Localisation d'*Et*-ApN3 au pôle apical du parasite pendant les phases précoces du développement et dans les M2..... 112
Figure 42 : Détection d'une forme active d'*Et*-ApN3 113
Figure 43 : Sélection des groupes de composés..... 129
Figure 44 : Sélection des composés 130
Figure 45 : Tests de spécificité relative..... 130
Figure 46 : C36 inhibiteur d'aminopeptidase N..... 131
Figure 47 : C36 inhibiteur du développement d'*E. tenella*..... 132
Figure 48 : C36 inhibiteur du développement de *Toxoplasma gondii* 134
Figure 49 : C36 inhibiteur du développement de *Plasmodium falciparum* 134
Figure 50 : C36 et ses analogues. 135
Figure 51 : Impact des pharmaco-modulations sur l'effet inhibiteur du C36..... 136
Figure 52 : Solubilité des composés 137
Figure 53 : Effets *in vitro* des dérivés du C36 sur le développement d'*E. tenella*..... 137
Figure 54 : Inhibition de l'activité aminopeptidase d'un lysat de tacyzoïtes..... 180
Figure 55 : Influence du C36 sur l'invasion de HFF par *Toxoplasma gondii*..... 181

Liste des annexes

Annexe 1 : Amorces 179
Annexe 2 : Activité du C36 sur *Toxoplasma gondii* 180
Annexe 3 : Dépôt de Brevet du composé C36 182
Annexe 4 : L'eimeripaïne, une protéase homologue de la cathepsine b, est exprimée pendant la sporulation du parasite apicomplexe *Eimeria tenella* 213
Annexe 5 : L'aminopeptidase N1 (*Et*-ApN1), une M1 métallo-protéase du parasite apicomplexe *Eimeria tenella,* participe au développement parasitaire 225

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
Ala	Alanine
AMC	7-Amido-4-methylcoumarin
ApN	Aminopeptidase N
APP	Aminopeptidase P
Arg	Arginine
ARN	Acide ribonucléique
ARN m	Acide ribonucléique messager
BCA	d'après l'anglais « Bicinchonic Acid »
bp	Base paire
DMEM	d'après l'anglais « Dulbecco's minimal essential medium »
DMSO	Dimethyl-sulfoxide
E.	*Eimeria*
Et	*Eimeria tenella*
Gly	Glycine
gp	Glycoprotéine
h	Heure(s)
HFF	d'après l'anglais « Human Foreskin Fibroblasts »
kbp	Kilo base paire
kDa	Kilo Dalton
LAP	Leucine aminopeptidase
M2	Mérozoïtes de 2ème génération
MDBK	d'après l'anglais « Madin-Darby bovine kidney »
min	Minute(s)
Mw	d'après l'anglais « Molecular weight »
Nc	*Neospora caninum*
PBS	d'après l'anglais « Phosphate-Buffered Saline »
PCR	d'après l'anglais « Polymerase chain Reaction »
p.i.	Post infection
Pf	*Plasmodium falciparum*
PFA	Paraformaldéhyde
Phe	Phénylalanine
RPMI 1640	d'après l'anglais «Roswell Park Memorial Institute medium»
r.s.m.d	d'après l'anglais «root-mean-square deviation »
s	Seconde(s)
SVF	Sérum de veau fœtal
Test MTT	Test au au dimethyl thiazoldiphenyl-tetrazolum bromide
Tg	*Toxoplasma gondii*
UV	Ultra-violet
Vmax	Vitesse maximale
YFP	d'après l'anglais « Yellow Fluorescent protein »

Introduction

Les *Eimeria* sont des parasites apicomplexes qui provoquent des maladies graves, appelées coccidioses. Elles engendrent des pertes économiques importantes dans le monde, principalement dans les élevages aviaires. Les symptômes associés à ces maladies sont, une morbidité importante (animal prostré, plumes ébouriffées), des altérations de la production (diminution de l'indice de consommation et chute de la ponte), des diarrhées sanglantes et une mortalité pour les cas sévères. Face à ce fléau, le moyen de lutte le plus utilisé est les anticoccidiens. Les anticoccidiens sont des molécules chimiques ou des ionophores, qui constituent les moyens de lutte privilégiés dans les élevages de poulets de chair. L'utilisation massive de ces molécules anticoccidiennes depuis 50 ans a induit l'émergence de populations parasitaires résistantes d'où l'importance d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour lutter plus efficacement contre la coccidiose aviaire.

Parmi les sept espèces responsables de la coccidiose aviaire, *E. tenella* est l'une des plus virulentes. Malgré la connaissance globale du cycle parasitaire, les mécanismes moléculaires impliqués dans les étapes clés du cycle restent à déterminer. Dans le but d'identifier et de mieux comprendre ces mécanismes moléculaires, l'équipe « Pathogenèse des coccidioses », de l'INRA Centre Val de Loire, étudie les facteurs de virulence d'*E. tenella* et les interactions hôte-pathogène entre *E. tenella* et l'organisme hôte, le poulet. L'une des thématiques développées dans l'équipe est l'étude des protéases parasitaires, des enzymes capables de cliver des protéines. Depuis près de 20 ans, une quantité croissante d'articles décrivent les protéases comme des facteurs de virulence parasitaires. Celles-ci sont impliquées dans de nombreux processus parasitaires : l'invasion, la croissance, le métabolisme, l'échappement au système immunitaire… Dans cette thèse nous nous sommes intéressés aux aminopeptidases de la famille M1 des métallo-protéases d'*E. tenella*, dont les homologues de *Plasmodium falciparum* sont impliqués dans le métabolisme et le développement. D'autres études portant sur les aminopeptidases de la famille M1 de mammifères et de végétaux ont démontré que leur inhibition entraînait un arrêt du cycle cellulaire et de la croissance. De ce fait, ces aminopeptidases de la famille M1 représentent des cibles thérapeutiques potentielles. L'identification des homologues d'*E. tenella* permettra d'évaluer si les aminopeptidases de ce parasite pourraient également représenter des cibles thérapeutiques dans le cadre de la lutte contre la coccidiose.

Synthèse bibliographique

A. Biologie du parasite

1. Classification et caractéristiques d'*Eimeria tenella*.

a. Impact des maladies parasitaires à l'échelle mondiale

Les maladies parasitaires ont un impact économique et sanitaire important à l'échelle mondiale (Tableau 1).

Espèce	Phylum	Région	Impact mondial
Plasmodium spp.	Apicomplexe	Zone tropicale	650 000 morts par an
Toxoplasma gondii	Apicomplexe	Monde	Plus de 2 milliards de personnes infectées
Eimeria spp.	Apicomplexe	Monde	2 milliards d'euros par an
Babesia spp.	Apicomplexe	Monde	1,2 milliards d'euros par an
Trypanosoma spp.	Kinetoplastidés	Amérique Latine Afrique	11 millions de personnes infectées par an
Leishmania spp.	Kinetoplastidés	Monde	10 millions de personnes infectées par an
Trichomonas spp.	Excavate	Monde	170 millions de personnes infectées par an
Entamoeba spp.	Amoebozoaire	Monde	700 millions de personnes infectées
Schistosoma spp.	Platyhelminthes	Zone tropicale	500 millions de personnes infectées

Tableau 1 : Impact des principaux parasites à l'échelle mondiale

Tableau non exhaustif des espèces parasitaires avec l'impact des maladies qu'elles engendrent. Ce tableau répertorie les espèces parasitaires, le phylum auquel elles appartiennent, leurs localisations géographiques et une estimation de leur impact à l'échelle mondiale. Chiffres provenant de l'agence de la santé publique du Canada (Mise à jour en 2004, www.santepublique.gc.ca).

Parmi les différents phylums représentés dans le Tableau 1, le phylum des apicomplexes regroupe les parasites engendrant le plus de mortalité et de pertes économiques (Figure 1).

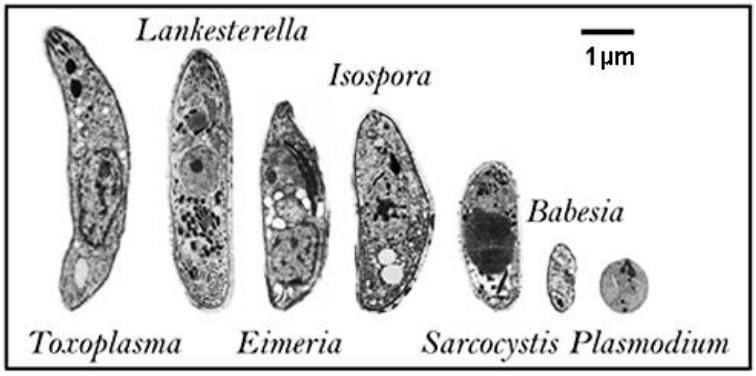


Figure 1 : Photos des principaux parasites apicomplexes

Photos de microscopie électronique des principaux parasites apicomplexes. (Scholtyseck 1962; Aikawa and Antonovych 1964)

b. Taxonomie

Les apicomplexes regroupent de nombreux parasites d'importance économique et médicale pour l'homme comme *Toxoplasma gondii*, agent de la toxoplasmose (Robert-Gangneux and Darde 2012), et *Plasmodium falciparum* l'un des agents de la malaria (Clark and Cowden 2003). Ils sont caractérisés par la présence d'une phase sexuée et d'une phase asexuée dans leur cycle biologique, un mode de locomotion par glissement et la présence d'un complexe apical (Figure 1 et 2).

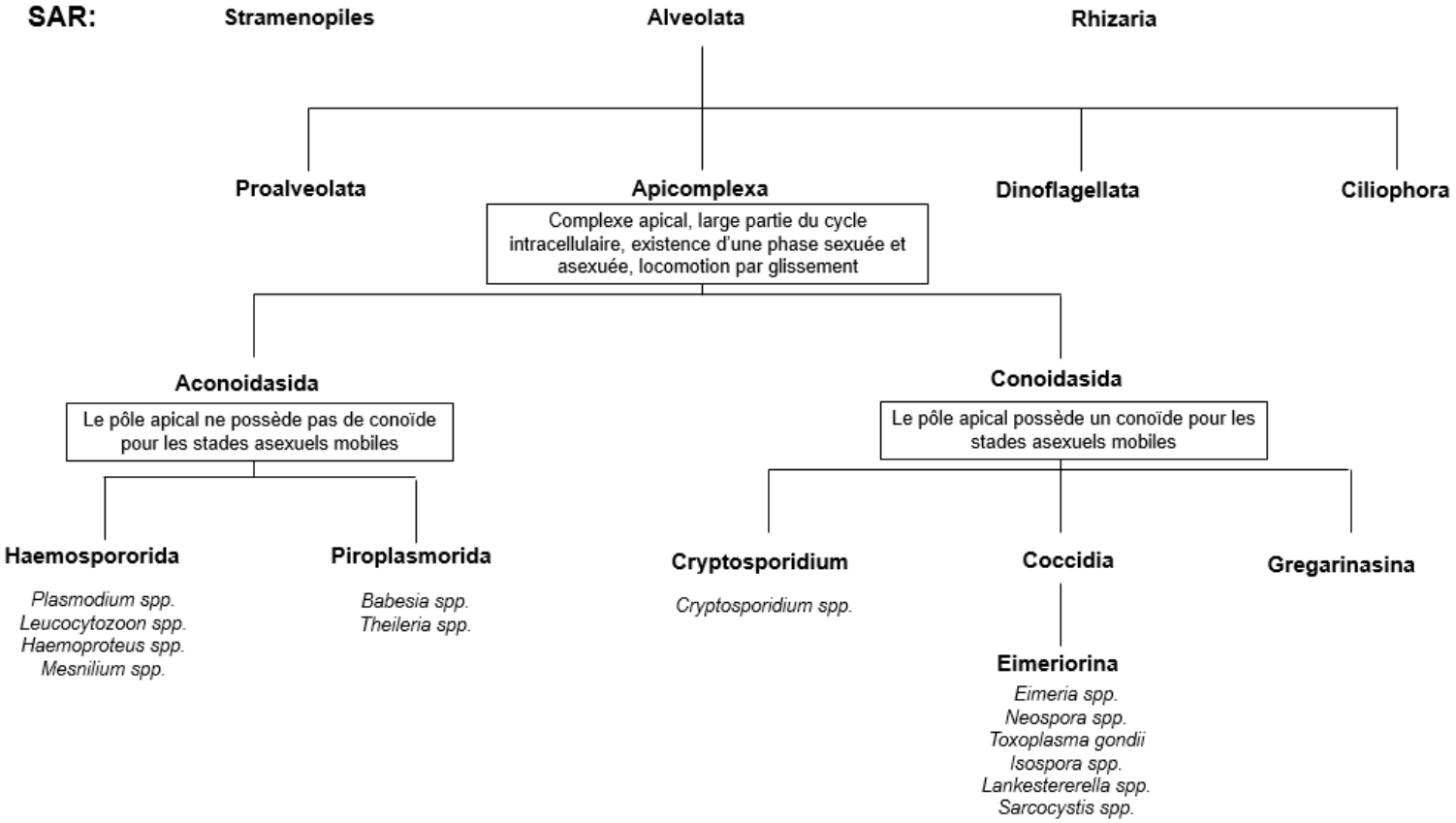


Figure 2 : Classification des protozoaires

Adapté de (Adl, Simpson *et al.* 2012) SAR à l'abréviation de **S**tramenopiles, **A**lveolata et **R**hizaria

Grâce aux banques de données, les génomes de certains apicomplexes peuvent facilement être comparés. Les génomes de *P. falciparum*, *T. gondii* et *E. tenella* sont disponibles (Kissinger, Milgram *et al.* 2001; Kissinger, Gajria *et al.* 2003; Reid, Blake *et al.* 2010). Comme l'illustre le Tableau 2, *E. tenella* est génétiquement plus proche de *T. gondii* que de *P. falciparum* (Kuo, Wares *et al.* 2008).

Nom	Hôte définitif	Hôte intermédiaire	% GC	Nombre de chromosomes	Nombre de gènes prédits	Taille génome (Mb)
E. tenella	Poulet	aucun	53	14	9235	60
T. gondii	Chat	Variable	52	14	9516	80
P. falciparum	Anophèle	Homme	19	14	5297	22,9

Tableau 2 : Comparaison de trois apicomplexes

Tableau comparatif entre *E. tenella, T. gondii et P. falciparum* sur la spécificité d'hôte et les données génomiques.Réalisé à partir des données des génomes (Kissinger, Milgram *et al.* 2001; Kissinger, Gajria *et al.* 2003; Reid, Blake *et al.* 2010).

Des travaux ont montré une conservation au sein du phylum des apicomplexes de certains facteurs de pathogénicité : les protéines des micronèmes, MIC (Tomley, Bumstead *et al.* 1996; Sheiner, Santos *et al.* 2010), des antigènes de surface, AMA-1 (Donahue, Carruthers *et al.* 2000; Kocken, Narum *et al.* 2000; Torina, Agnone *et al.* 2010; Jiang, Lin *et al.* 2012) ou des protéases homologues de la cathepsine B (Greenbaum, Baruch *et al.* 2002; Que, Ngo *et al.* 2002; Rieux, Gras *et al.* 2012). Ces données suggèrent que des protéines conservées entre *Toxoplasma* et *Plasmodium* dans des processus tels que le développement et le métabolisme du parasite sont probablement aussi conservées chez *Eimeria*.

c. Les *Eimeria* de poulets

Le plus grand genre du phylum des apicomplexes est le genre *Eimeria,* qui contient plus de 1000 espèces différentes décrites à ce jour. Ces parasites sont ubiquitaires et infectent un large spectre d'hôtes : mammifères, oiseaux, reptiles, amphibiens, poissons. Ils causent des coccidioses, maladies liées à la multiplication du parasite dans les cellules du système digestif de leurs hôtes (Taylor 1996). Cependant par opposition à d'autres parasites du phylum comme *T. gondii*, les *Eimeria spp.* ont une très grande spécificité d'hôte. Par exemple, les coccidioses de la dinde ne sont pas transmissibles au poulet. Sept espèces d'*Eimeria* ont été identifiées chez le poulet: *E. acervulina*, *E. maxima, E. tenella, E. necatrix, E. praecox*, *E. mitis* et *E. brunetti* (Figure 3).

.

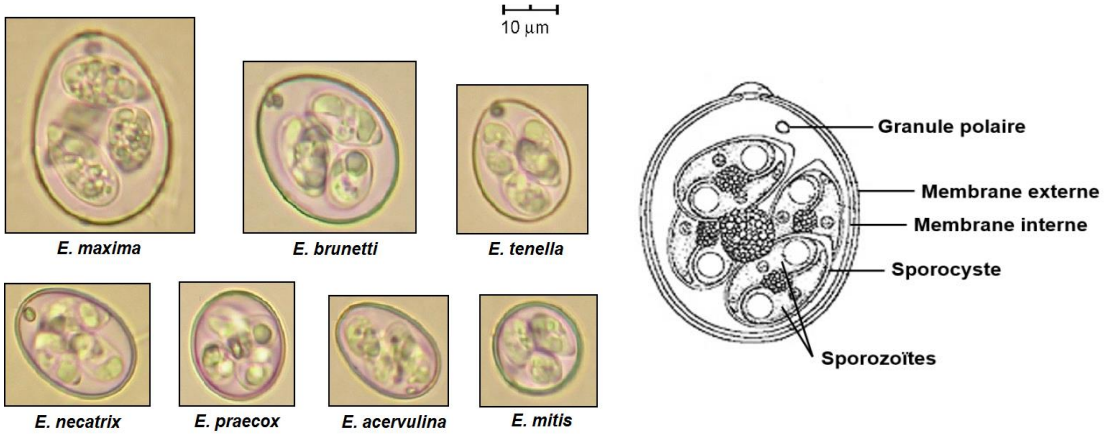
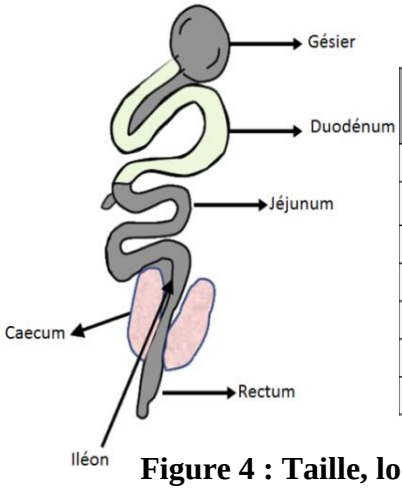


Figure 3 : Oocystes des sept espèces d'*Eimeria*

Photographie en lumière blanche des sept espèces d'*Eimeria* de poulet et schéma de la structure d'un oocyste.

Levine a résumé et schématisé la structure des oocystes matures des *Eimeria* (Levine 1963). Les oocystes sont protégés par une double membrane très résistante et contiennent 4 sporocystes. Chaque sporocyste contient 2 sporozoïtes, unités infectantes du parasite, soit 8 sporozoïtes par oocyste (Figure 3). L'identification de l'espèce est fondée sur sa morphologie (Castañón, Fraga *et al.* 2007), sa localisation dans l'intestin du poulet, son pouvoir pathogène et sa période pré-patente (Naciri 2000) (Figure 4).



Nom	Taille moyenne des oocystes Lxl moyenne (µm)	Localisation	Période prépatente (heures)
E. maxima	30,5 x 20,7	Jéjunum, iléon	120
E. brunetti	24,6 x 18,8	Iléon, caeca, rectum	120
E. tenella	22,0 x 19,0	Caeca	132
E. necatrix	20,4 x 17,2	Jéjunum	138
E. praecox	21,3 x 17,1	Duodenum, jéjunum	84
E. acervulina	18,3 x 14,6	Duodenum, jéjunum	89
E. mitis	15,6 x 14,2	Iléon, caeca, rectum	91

Figure 4 : Taille, localisation et périodes pré-patentes des espèces d'*Eimeria* aviaires

Schéma du tractus digestif du poulet et tableau récapitulatif permettant la caractérisation des différentes espèces d'*Eimeria*.

d. Cycle parasitaire

Les *Eimeria* sont des espèces monoxènes, le cycle comporte un seul hôte. Le cycle biologique est divisé en trois phases : la **sporogonie**, la **schizogonie** et la **gamogonie** (Figure 5). Le poulet s'infecte en ingérant des oocystes sporulés présents dans le milieu environnant : dans les litières, la nourriture ou l'eau. Une fois ingérés, les oocystes sporulés sont mécaniquement broyés au niveau du gésier, ce qui libère les sporocystes. Au niveau du

duodénum et sous l'action d'enzymes pancréatiques, comme la trypsine et des sels biliaires, les sporocystes libèrent les sporozoïtes, c'est l'étape d'excystation. Les sporozoïtes pénètrent activement les cellules épithéliales de l'intestin ou des caeca en fonction de l'espèce parasitaire. C'est le début de la phase de **schizogonie**. Après avoir envahi les cellules, les parasites se différentient en trophozoïtes. Un processus de division nucléaire se met en place aboutissant à la formation de schizontes (ou mérontes).

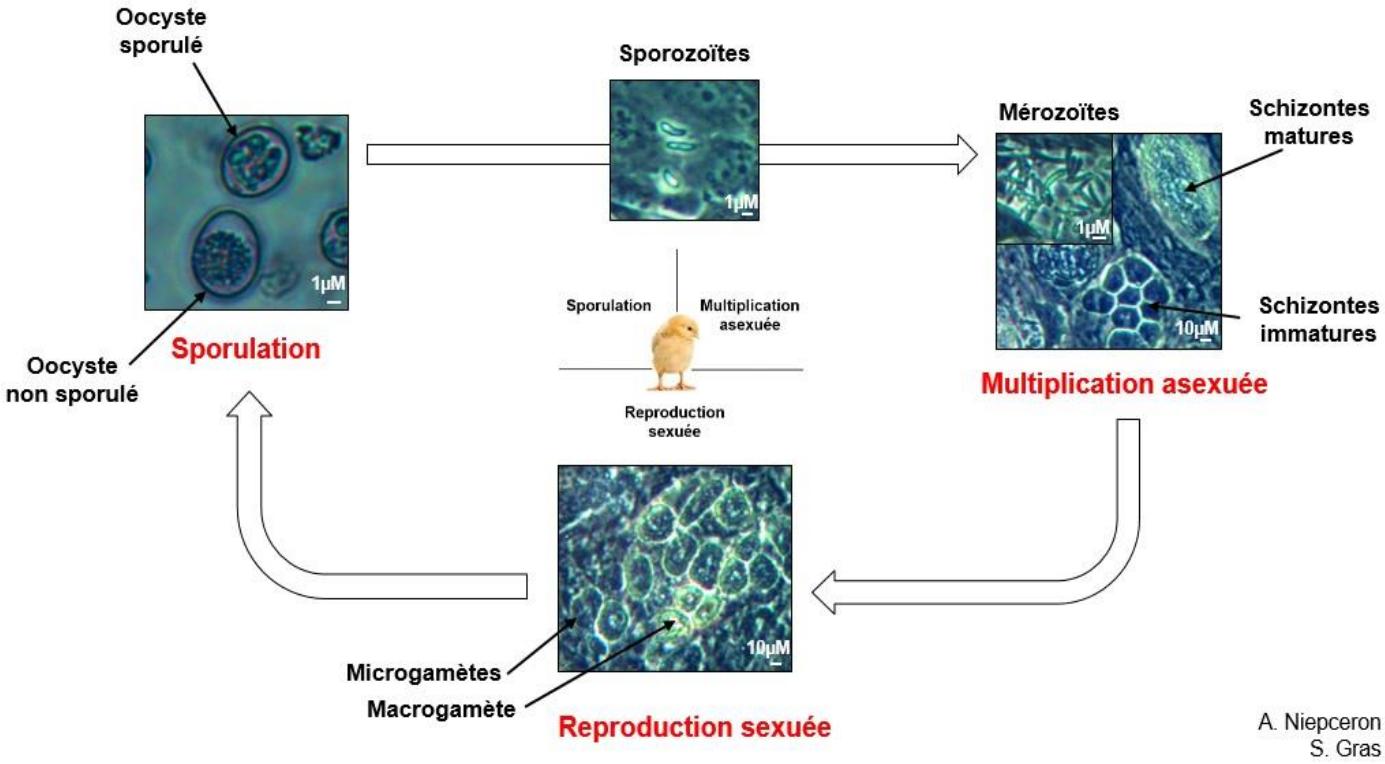


Figure 5 : Cycle biologique des *Eimeria* de poulet

Représentation schématique du cycle biologique d'*Eimeria spp*. avec les 3 grandes étapes : la sporulation (phase environnementale), la multiplication asexuée et la reproduction sexuée (phases intracellulaire).

Une fois à maturité, les schizontes font éclater les cellules, libérant plusieurs centaines de mérozoïtes. Ces mérozoïtes vont envahir à leur tour les cellules épithéliales voisines. Selon les espèces, le cycle comprend 2 à 4 multiplications asexuées successives. Au terme de la dernière multiplication asexuée, les mérozoïtes envahissent les cellules et se différencient en gamontes femelles (macrogamontes) et gamontes mâles (microgamontes), c'est la **gamogonie.** Les macrogamontes effectuent leur maturation sans se diviser et engendrent des macrogamètes. En revanche, les microgamontes vont se diviser et aboutir à la production de nombreux microgamètes biflagellés et mobiles. Une fois mature, les microgamètes fécondent les macrogamètes, donnant ainsi naissance à des zygotes qui prendront le nom d'oocyste après formation leur coque. Ces oocystes sont libérés avec les fèces du poulet dans le milieu

extérieur, c'est le début de la **sporogonie**. L'oocyste libéré n'est pas infectant. C'est sous des conditions spécifiques de température et d'hydrométrie que l'oocyste non sporulé deviendra un oocyste sporulé infectant contenant les 4 sporocystes, c'est le processus de sporulation. Le temps de sporulation des différentes espèces d'*Eimeria* est variable.

e. Caractéristique d'*E. tenella*

Anciennement appelé *Coccidium tenellum* ou *Coccidium perforum*, c'est en 1981 que les zoologistes français, A. Railliet et A. Lucet, donnent son nom à *E. tenella* (Railliet 1891). C'est l'une des espèces d'*Eimeria* les plus virulentes et la première dont le génome a été séquencé et partiellement annoté (Reid, Blake *et al.* 2010).

Comme pour les autres parasites apicomplexes, un complexe est présent au pôle apical dans les sporozoïtes d'*E. tenella* (Figure 6). Différents organites le composent : le conoïde, les micronèmes, les rhoptries, et des granules denses. L'ensemble de ces structures joue un rôle essentiel dans le cycle biologique et notamment l'invasion des cellules de l'hôte en sécrétant des molécules, telles que les MIC des micronèmes qui servent à l'interaction entre le parasite et la cellule hôte (Tomley, Bumstead *et al.* 1996). En plus des autres organites classiques (noyau, réticulum endoplasmique, complexe du Golgi, mitochondries) *E. tenella*, comme les autres espèces du genre *Eimeria*, possède deux corps réfringents : un corps réfringent antérieur par rapport au noyau, généralement petit et de forme ronde et un postérieur plus grand et de forme ovale (de Venevelles, Francois Chich *et al.* 2006). La fonction précise de ce compartiment qui occupe près de la moitié du volume intracellulaire du sporozoïte reste inconnue.

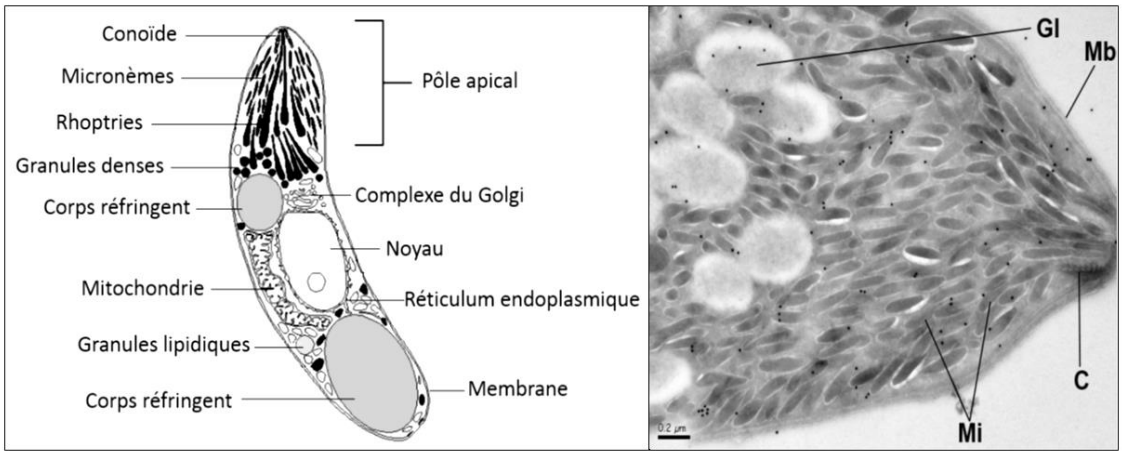


Figure 6 : Ultrastructure d'*Eimeria tenella*

Schéma de la structure d'un sporozoïte et photographie en microscopie électronique d'un pôle apical d'*E. tenella*. Sur la figure sont indiqués le conoïde (C), les micronèmes (Mi), la membrane (Mb) et les granules lipidiques (Gl). Photo de microscopie électronique (J. Gaillard et S. Gras).

E. tenella infecte spécifiquement les cellules épithéliales des caeca. Son cycle dure entre 5 à 7 jours selon les souches. La virulence de l'espèce *E. tenella* vient de son importante multiplication asexuée. Un oocyste ingéré va libérer 8 sporozoïtes. Chaque sporozoïte qui envahit peut alors se différencier en schizonte, qui une fois mature, produit environ 900 mérozoïtes de première génération (M1). Chacun de ces M1 donne de 200 à 350 mérozoïtes de deuxième génération (M2). Ces mérozoïtes peuvent donner une troisième génération de mérozoïtes ou se différencier directement en gamontes pour finir le cycle. Au final, un oocyste d'*E. tenella* ingéré produit plus de 500 000 nouveaux oocystes. Après 72 h de sporulation, chaque oocyste est prêt à recommencer un nouveau cycle.

f. Les outils d'étude des *Eimeria spp.*

E. tenella est un des agents de la coccidiose les plus étudiés et des outils ont été développés pour étudier son cycle biologique. Plusieurs modèles cellulaires peuvent être utilisés pour l'étude d'*E. tenella in vitro* (Tierney and Mulcahy 2003). Les cellules MDBK (Madin-Darby bovine kidney) et les cellules PCKC (Primary chicken kidney cells) sont les deux modèles cellulaires les plus couramment utilisés. Les cellules MDBK permettent d'étudier les étapes d'invasion des cellules par les parasites, et la première multiplication asexuée (maturation des schizontes et libération des mérozoïtes de première génération). Bien que les cellules MDBK ne permettent l'obtention que des premiers stades parasitaires, l'immortalité de cette lignée cellulaire en fait le modèle de prédilection. Les cellules PCKC sont des cellules primaires de reins de poulet dans lesquelles le cycle endogène peut être réalisé dans son intégralité. Leur utilisation est favorisée pour l'étude des stades sexués (Strout and Ouellette 1968).

Outre la souche sauvage d'*E. tenella*, il existe des souches dites « précoces », Wis96 et Wis125. Ces souches ont été obtenues par sélection répétée des premiers oocystes excrétés dans les litières. La souche Wis96 ne possède qu'un seul cycle de multiplication asexuée (Jeffers 1975). Cette souche dont le cycle a été raccourci, permet l'obtention *in vitro* des gamètes en 5 jours au lieu de 7 jours avec la souche sauvage (McDougald and Jeffers 1976). Finalement, des techniques de transfection sont également disponibles et permettent l'expression, de manière stable, de protéines chez *E. tenella*, comme la « Yellow fluorescent protein » (souche Wis YFP+) ou une protéine recombinante présentant une étiquette telle qu'un fluorochrome (Rieux, Gras *et al.* 2012). Les techniques de Knock down et de RNAi ne sont pas actuellement disponibles chez *E. tenella*.

2. Coccidiose aviaire

La viande de volaille est la deuxième viande la plus consommée dans le monde, après la viande de porc. En 2010 à l'échelle mondiale, c'est 95,7 millions de tonnes de volaille qui ont été produites pour un chiffre d'affaire d'exportation d'environ 8,1 milliards d'euros. Cela représente une croissance en production de 30 % par rapport à 2005 (l'ITAVI 2012). La coccidiose aviaire est la maladie parasitaire la plus importante touchant l'industrie de la volaille et coûte chaque année plus de 2 milliards d'euros (Williams 1999; Naciri 2008).

a. Épidémiologie

La coccidiose aviaire impacte à l'échelle mondiale de nombreux élevages de poulets. La prévalence est tellement importante que les élevages sont systématiquement traités de manière préventive contre la coccidiose. Les espèces les plus retrouvées au sein des élevages sont *Eimeria acervulina, Eimeria maxima* et *Eimeria tenella* (Bachaya, Raza *et al.* 2012). Il est important de noter que la virulence entre les espèces est également variable : *E. tenella* et *E. necatrix* pouvant entraîner la mort des animaux alors que *E. praecox* n'induit aucune lésion intestinale. La connaissance des caractéristiques spécifiques à chaque espèce (site de développement, formes et tailles des oocystes) permet aux industriels gérant les élevages d'identifier les différentes espèces d'*Eimeria* présentes lors d'un épisode de coccidiose. Des techniques de biologie moléculaire de « Polymerase chain Reaction » (PCR) sont également disponibles (Morgan, Morris *et al.* 2009). Le développement de la coccidiose est influencé par l'état de santé des animaux, leur alimentation, et les conditions d'élevage.

b. Symptômes

Lors d'une coccidiose, les poulets infectés présentent des symptômes physiques. Les animaux adoptent une posture prostrée, perdent des plumes et, selon les espèces d'*Eimeria* les infectant, peuvent présenter des diarrhées sanglantes (Figure 7). L'impact le plus important pour l'industrie est lié à l'altération du développement des animaux : une perte de poids, une chute de l'indice de consommation (Kipper, Andretta *et al.* 2013) et une chute de la ponte (Hegde and Reid 1969). Même si la mort des animaux n'est pas systématique, elle reste une conséquence importante de la maladie (Challey, Jeffers *et al.* 1968). Les oocystes libérés dans l'environnement sont très résistants, supportant même des traitements chimiques (hypochlorite de sodium, éthanol), ce qui facilite la propagation de la maladie. La résistance

des oocystes aux traitements extérieurs fait que la lutte contre cette maladie doit intervenir avant l'excrétion des oocystes.

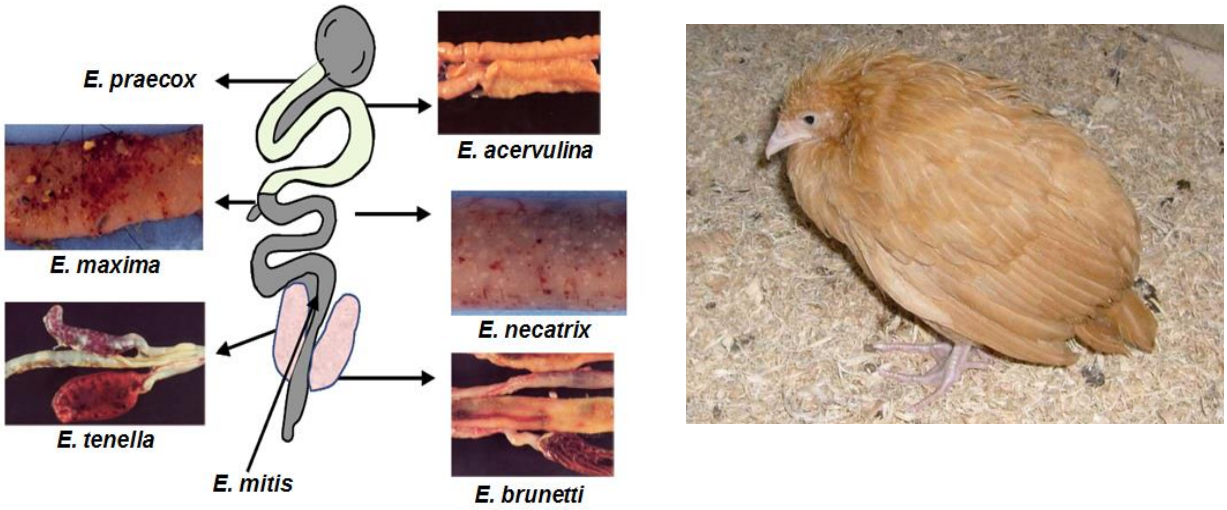


Figure 7 : Effets macroscopiques des coccidioses

Illustration des différentes lésions causées par les coccidies du poulet et leurs localisations dans le tractus digestif, ainsi qu'une photographie d'un poulet contaminé. On observe sa posture prostrée et ses plumes ébouriffées.

c. Contrôle et moyens de lutte

Le contrôle de la coccidiose repose avant tout sur un traitement préventif de la maladie. Ce traitement est adapté aux différents types d'élevages : poulets de chair, poules pondeuses ou poulets de reproduction.

L'un des premiers moyens de lutte contre la coccidiose est la gestion de l'environnement de l'élevage pour éviter des conditions propices au développement de la maladie. Une litière sèche, renouvelée régulièrement, avec une bonne aération des locaux pour diminuer l'humidité ambiante, ralentira la sporulation des parasites qui nécessite des conditions d'humidité et de température optimales (Graat, Henken *et al.* 1994).

La lutte contre la coccidiose fait également appel à des drogues anticoccidiennes. La plupart des élevages sont traités de manière préventive et continue. Pour les poulets de chair, 11 molécules anticoccidiennes sont actuellement autorisées sur le marché. Elles sont classées en deux catégories : les produits chimiques de synthèse qui altèrent le métabolisme du parasite (décoquinate, diclazuril, halofuginone, nicarbazine et robénidine) et les ionophores dérivés de la fermentation microbienne, qui inhibent le transport des ions à travers la membrane du parasite (lasalocid, maduramicine, narasin, salinomycine, semduramicine et monensin). L'utilisation de ces molécules se fait en suivant un programme de rotation entre

les différentes couches de litières ou entre chaque batterie d'animaux (Tewari and Maharana 2011). Ce programme de rotation est nécessaire pour éviter la sélection de souches résistantes par l'utilisation massive d'un seul anticoccidien pendant une période trop longue. L'arrêt des traitements est, en général, réalisé 5 à 7 jours avant l'abattage pour éviter la présence d'anticoccidiens dans la viande.

Outre les anticoccidiens, il existe également des vaccins. En Europe, ils sont constitués de souches atténuées issues des 7 espèces d'*Eimeria.* Leur utilisation est favorisée dans les élevages de poules pondeuses, de reproducteurs et de l'agriculture biologique (Williams 1999; Fuscien 2012). Cependant, leur coût est environ 8 fois plus élevé que celui des anticoccidiens (Williams 1999).

Si malgré les traitements préventifs, un élevage est atteint de coccidiose, deux traitements curatifs existent. Ces traitements consistent en l'administration de sulphonamide ou de toltrazuril qui ne sont utilisés qu'en ultime recours car ces deux molécules très efficaces présentent des effets secondaires néfastes, notamment une cytotoxicité élevée (CIBPvet 2013; Interchemie 2013).

d. Développement de méthodes alternatives

Face au coût élevé de production des vaccins (multiplication de souches atténuées) et la résistance croissante aux anticoccidiens, la recherche vise à développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour lutter contre la coccidiose aviaire (Peek and Landman 2011). Différentes pistes ont été étudiées.

L'une des pistes les plus prometteuses est la production de vaccins recombinants. Des recherches ont été menées afin d'évaluer le potentiel immunogène d'antigènes parasitaires, leur voie d'administration, les vecteurs utilisés… Les antigènes qui ont été testés proviennent de différents stades de développement d'*Eimeria*, comme des protéines impliquées dans l'invasion, les micronèmes (Zhang, Ma *et al.* 2012), des protéines constitutives du corps réfringent du parasite, SO7 (Song, Qiu *et al.* 2012) ou encore des protéines des gamètes, GAM56 et GAM85 (Sharman, Smith *et al.* 2010). L'antigène utilisé correspond à une protéine chimère, une protéine native ou une protéine recombinante produite par des bactéries (*E. coli*) ou des baculovirus (Tewari and Maharana 2011). Différents vecteurs ont été également testés, ainsi que l'ajout d'adjuvant, la présentation par des bactéries ou des virus. L'antigène SO7 présenté par un virus Herpès montre des résultats intéressants, avec une forte chute de la production d'oocystes et une limitation de la perte de l'indice de consommation

(Vermeulen 1998). À ce jour, le meilleur résultat obtenu concerne les antigènes GAM56/GAM85. Ce vaccin est composé de ces deux glycoprotéines purifiées et est directement injecté aux poules reproductrices qui transmettent leur immunité à leur descendance directe par le biais d'immunoglobulines Y contenues dans le blanc de l'œuf. Ce vaccin est actuellement commercialisé en Australie : CoxiAbic® (Sharman, Smith *et al.* 2010).

Une autre piste prometteuse est la phytothérapie. L'ajout de certaines plantes ou dérivés (curcuma, galas, carvacrol…) dans l'alimentation permet de réduire les symptômes de la coccidiose (Lee, Hong *et al.* 2012; Zaman, Iqbal *et al.* 2012). Cette complémentation alimentaire stimule le système immunitaire des poulets (Michels, Bertolini *et al.* 2011), diminuant les réactions inflammatoires de l'épithélium intestinal (Kim, Lillehoj *et al.* 2013). Certains extraits de plantes tels que le curcuma, agissent directement sur *Eimeria* en inhibant l'invasion (Burt, Tersteeg-Zijderveld *et al.* 2013). Cette méthode de lutte contre la coccidiose est déjà utilisée dans certains élevages biologiques (ITAB 2009; FRAB 2012).

La piste de la résistance génétique a également été étudiée. Les poulets de la race Fayoumi, originaires d'Égypte, sont naturellement résistants à la coccidiose (Pinard-Van Der Laan, Monvoisin *et al.* 1998). Des travaux de croisement ont été initiés dans les années 80, cependant les travaux ne semblent pas avoir été poursuivis au-delà des croisements pour une première génération (Hamet, Mérat *et al.* 1982). Les animaux issus de ces croisements entre la race Fayoumi et une race industrielle (White leghorn) possèdent des degrés de résistance variables mais inférieurs à la Fayoumi, et un gain de poids inférieur à celui de la White leghorn. Cependant, l'idée de sélectionner les gènes de résistance n'a pas été abandonnée ; de nouvelles études ont été réalisées pour identifier directement les gènes impliqués dans la résistance de la race Fayoumi à la coccidiose (Heams, Bed'hom *et al.* 2011).

Une dernière piste, plus récente, est l'utilisation d'inhibiteurs dirigés contre des enzymes parasitaires (Engels, Beyer *et al.* 2010; Rieux, Gras *et al.* 2012). En effet, les enzymes jouent des rôles clefs dans le contrôle du cycle, de la croissance et de la mort cellulaire. Des inhibiteurs dirigés contre celles-ci conduisent à l'arrêt du cycle parasitaire. Dans cette thèse, nous nous sommes spécifiquement intéressés à un type d'enzyme en particulier, les protéases.

B. Les protéases

1. Généralités sur les protéases

Dans un organisme, la production des protéines est finement régulée. Afin qu'une protéine puisse être exprimée, il faut dans un premier temps que l'ADN soit transcrit en ARN. Ensuite cet ARN est traduit en protéine. Finalement, cette protéine néo-synthétisée devra subir des modifications post-traductionnelles pour être active et jouer son rôle. Ces modifications se font par l'intermédiaire de différentes enzymes. Il en existe de nombreux types tels que les kinases (ajout de phosphate), les glycosyltransférases (ajout de sucre), ou des protéases/peptidases (clivage des protéines). C'est cette dernière catégorie d'enzymes qui va nous intéresser.

a. Fonction

Les protéases/peptidases sont par définition des protéines qui clivent les liaisons peptidiques entre les acides aminés d'autres protéines. Il y a près de 700 protéases codées dans le génome humain (Page and Di Cera 2008) et elles sont impliquées dans des processus tels que le remodelage de la matrice extracellulaire, le développement, la maturation de protéine, l'immunité, la signalisation et la mort cellulaire (Puente, Sanchez *et al.* 2003). Leurs rôles clefs en font des sujets d'étude de premier choix, d'autant plus que leurs dérèglements entraînent souvent l'apparition de pathologies.

b. Classification

Le premier critère de classification des protéases est leur mode de fonctionnement, il en existe 3 grandes classes (Figure 8) (Rawlings and Barrett 1993; Rawlings, Barrett *et al.* 2012). Les exopeptidases sont des protéases qui coupent les protéines à leurs extrémités. Parmi les exopeptidases, il en existe deux catégories : les aminopeptidases qui coupent du côté N-terminal et les carboxypeptidases, du côté C-terminal. Les aminopeptidases prennent le nom de dipeptidyl-peptidases ou de tripeptidyl-peptidases lorsqu'elles clivent deux ou plus de deux acides aminés. La troisième classe de protéase, les endopeptidases, coupent à l'intérieur de la chaîne peptidique et non aux extrémités.

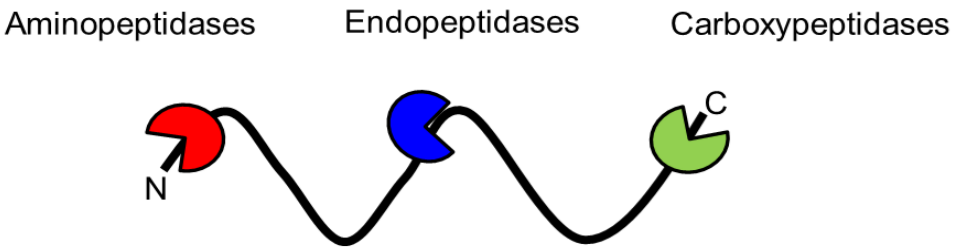


Figure 8 : Les 3 catégories de protéases

En rouge les aminopeptidases, en bleu les endopeptidases et en vert les carboxypeptidases

Une autre manière de les classer est d'indiquer le type catalytique des protéases c'est-à-dire en fonction de l'acide aminé le plus réactif lors de l'hydrolyse. Six différents types de protéases sont ainsi retrouvés (Arginine, Sérine, Cystéine, Thréonine, Glutamique et Métallo protéases) regroupant la majorité des protéases connues à ce jour (Hartley 1960; Rawlings and Barrett 1993). Il existe une minorité de protéases dont le type catalytique reste inconnu. La dernière méthode de classification qui est la plus récente, se base sur la structure moléculaire et les homologies avec d'autres protéases. Elle repose sur la comparaison des séquences en acides aminés et la structure tridimensionnelle (3D) de nombreuses autres protéases. Au final, les enzymes sont regroupées en familles et en clans en fonction de ces paramètres. Une nomenclature spécifique, le numéro EC, regroupe toutes ces informations sous un système numérique codifié mis en place en 1961. L'ensemble des données disponibles sur les protéases est regroupé dans des banques de données comme MEROPS et BRENDA (Rawlings, Barrett *et al.* 2012; Schomburg, Chang *et al.* 2013).

c. Aminopeptidases

Les aminopeptidases regroupent toutes les protéases coupant du coté N-terminal une protéine ou un peptide (EC 3.4.11). Elles sont présentes dans tout le règne du vivant. Elles sont essentielles à la maturation de protéines, à la dégradation de peptides et leurs dysfonctionnements sont associés à de nombreuses pathologies, telles que les cancers (Brueggemeier 2004). On distingue plusieurs grands groupes d'aminopeptidases (Tableau 3). Elles sont classées en familles, en fonction de leur efficacité à cliver certains acides aminés, de l'ion métallique utilisé comme cofacteur et leur sensibilité aux inhibiteurs de protéases. La grande majorité d'entre elles requièrent des ions zinc, Zn^{2+}, comme cofacteur ; elles sont définies comme des métallo-protéases à zinc. La bestatine, l'amastatine et la 1,10-ortho-phénantroline sont les 3 principaux inhibiteurs des aminopeptidases. Chacune de ces familles possède également des signatures qui sont des motifs protéiques et des structures qui leur sont propres.

Nom	Substrat le plus spécifique	Numéro EC	Autre nom
Leucyl-aminopeptidase	Leucine	3.4.11.1	M17 LAP
Arginine aminopeptidase	Arginine	3.4.11.6	Aminopeptidase B
Methionyl-aminopeptidase	Méthionine	3.4.11.18	MetAP
Alanyl-aminopeptidase	Alanine	3.4.11.2	Aminopeptidase N
Prolyl-aminopeptidase	Proline	3.4.11.5	Pro-X aminopeptidase
Cystinyl-aminopeptidase	Cystéine	3.4.11.3	-

Tableau 3 : Les aminopeptidases

Présentation des différentes aminopeptidases existantes avec le substrat pour lequel elles sont les plus spécifiques par rapport aux autres aminopeptidases, le numéro EC ainsi que les appellations couramment utilisées. Les Cystinyl aminopeptidases possèdent un nombre de noms trop variables pour être référencés dans ce tableau. Données issues de la banque de donnée BRENDA (http://www.brenda-enzymes.info/).

d. Aminopeptidases N

Les Alanyl-aminopeptidases (EC 3.4.11.2) également appelées aminopeptidases N (ApN/CD13) appartiennent à la famille des métallo-protéases du type M1. Elles sont caractérisées par l'utilisation d'un seul ion zinc comme cofacteur, la présence du motif : $HExxHx_{18}E$, (H = histidine, E = glutamate et x n'importe quel acide aminé) impliqué dans la fixation du zinc, la sensibilité à la bestatine et l'amastatine mais également aux chélateurs d'ions comme la 1,10-ortho-phénantroline. Les aminopeptidases N possèdent aussi un motif : GAMEN (G = Glycine, A = Alanine, M = Méthionine, E = Glutamate, N = Asparagine). Des expériences de mutagénèse dirigée ont montré le rôle crucial de ce site dans le bon fonctionnement de l'enzyme (Luciani, Marie-Claire *et al.* 1998).

Les aminopeptidases N semblent avoir conservé des rôles multifonctionnels au sein du règne du vivant. La surexpression de l'ApN/CD13 humaine est associée à de nombreuses formes de cancer (Kehlen, Lendeckel *et al.* 2003; Fontijn, Duyndam *et al.* 2006; Saxena, Rai *et al.* 2010; Kim, Haraguchi *et al.* 2012). En revanche, l'utilisation d'inhibiteurs ou d'anticorps dirigés contre ApN/CD13 (Lohn, Mueller *et al.* 2002; Schmitt, Voegelin *et al.* 2013) permet de ralentir le cycle cellulaire et même de traiter certains cancers. Une inhibition par mutagénèse dirigée des sites actifs des ApN d'*Arabidopsis thaliana*, le modèle végétal le plus utilisé en laboratoire, conduit à un fort ralentissement du développement (Hosein, Bandyopadhyay *et al.* 2010). Une abrogation du développement est également observée chez

P. falciparum, un des agents de la malaria, par l'utilisation d'inhibiteurs d'aminopeptidases sur des cultures infectées (Nankya-Kitaka, Curley *et al.* 1998; Flipo, Beghyn *et al.* 2007; Harbut, Velmourougane *et al.* 2011). L'implication des ApN chez les apicomplexes sera plus détaillée dans la partie consacrée aux protéases parasitaires en partie 4a de ce chapitre.

2. Mécanismes d'action des protéases

a. Hydrolyse d'un substrat

Les protéases catalysent une réaction chimique : l'hydrolyse. Cette réaction entre la protéase et son substrat conduit à la formation de peptides, voir d'acides aminés libres par la rupture d'une liaison peptidique en consommant une molécule d'eau. Cette propriété peut être utilisée pour déterminer et suivre l'activité d'une protéase ; dans l'exemple ci-dessous (Figure 9) l'hydrolyse du complexe peptide-AMC conduit à la libération de 2 produits : un peptide et le substrat fluorescent, le 7-amino-4-methyl-coumarin (Miller, Adamczyk *et al.*) (Simpson 2001). Quand l'AMC est couplé à un peptide, il n'est pas fluorescent. Après la réaction d'hydrolyse par une protéase, l'AMC libre émet de la fluorescence qui peut être suivie à l'aide d'un fluorimètre (longueur d'onde d'excitation de 350 nm et longueur d'émission de 440 nm).

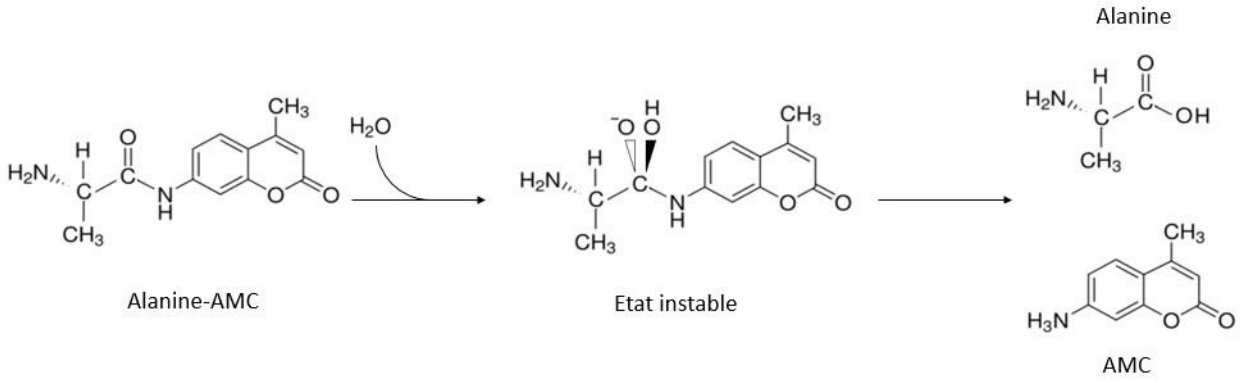


Figure 9 : Hydrolyse d'un substrat AMC

Illustration du clivage d'un substrat fluorescent couplé à l'AMC sous l'action d'une protéase.

Si l'on enregistre la cinétique de cette réaction, une différence d'unité de fluorescence par minute est obtenue. Deux phases sont observées : la phase d'activité où le substrat est hydrolysé, caractérisée par une pente et un plateau qui correspond à un arrêt de la réaction, majoritairement lié à un épuisement du substrat (Figure 10).

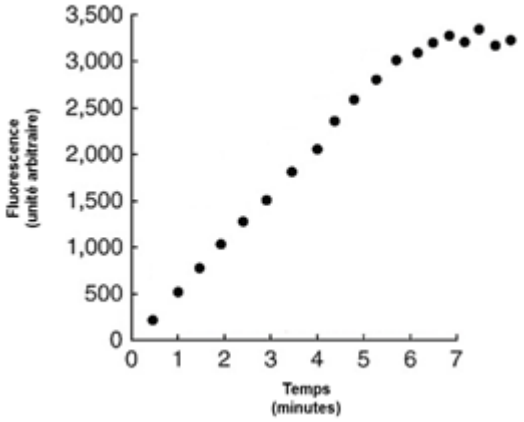


Figure 10 : Enregistrement d'une activité protéolytique

Illustration d'un enregistrement de l'activité d'une protéase contre le substrat peptide-AMC. Une augmentation linéaire de la fluorescence est observée dans un premier temps, puis la fluorescence émise cesse d'augmenter, c'est le plateau qui correspond généralement à l'épuisement du substrat.

Les réactions entre les protéases et leurs substrats sont caractérisées par plusieurs paramètres : l'affinité ou son inverse : la constante de Michaelis, la constante catalytique et la constante de spécificité.

b. Affinité, site catalytique et constante de Michaelis

Le premier paramètre pour caractériser l'interaction protéase/substrat est l'affinité. Chaque protéase peut interagir avec un nombre variable de substrats, et son efficacité d'action dépend de l'affinité de l'enzyme pour le substrat. Cette affinité est directement liée à la structure secondaire et tertiaire de l'enzyme qui va donner la forme du site actif. Ce site actif est une « poche » dans l'enzyme qui va contenir un site de liaison et de reconnaissance du substrat ainsi que le site catalytique qui permet la réaction. La forme de la poche sera liée à la nature des acides aminés qui la composent de part leur hydrophobicité et leur charge (Novinec, Kovacic *et al.* 2010) (Figure 11).

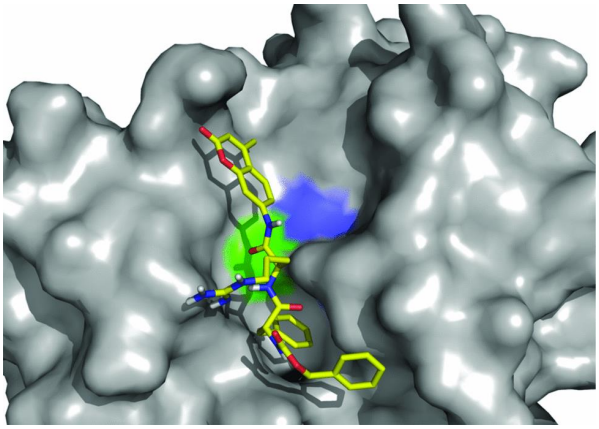


Figure 11 : Représentation tridimensionnelle de l'interaction en la cathepsine K et un substrat

Interaction entre la cathepsine K et le Z-FR-AMC (Benzyloxcarbonyl-L-phenylalanine-L-arginine-7-amino-4-methylcoumarîne). Est représenté en jaune le substrat, et en vert et bleu, les résidus catalytiques, cystéine 25 et histidine 162, respectivement.

Cette affinité est inversement proportionnelle à la valeur de la constante Michaelis (K_m)de l'enzyme envers le substrat (Michaelis, Menten *et al.* 2011). Plus le K_m est faible, plus l'affinité de la protéase pour le substrat est forte. Le K_m s'exprime en molarité (M) de substrat.

Le K_m peut être calculé de différentes manières, la plus simple étant de fixer une concentration d'enzyme titrée et de tester une concentration croissante de substrat. Lors de chaque test, les vitesses initiales pour chaque concentration sont enregistrées jusqu'à atteindre une vitesse maximale, Vmax (Molarité de substrat/s^{-1}). Le K_m correspond à la quantité de substrat nécessaire pour obtenir une vitesse égale à Vmax/2 (Figure 12). Pour une même enzyme, le K_m varie en fonction du substrat.

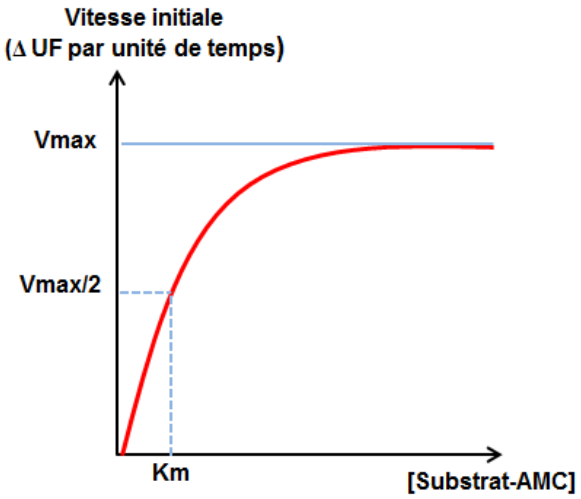


Figure 12 : Constante de Michaelis

Exemple du calcul du K_m d'une réaction enzymatique avec un substrat AMC. La Vmax correspond à la vitesse de réaction au niveau de la phase stationnaire et le Vmax/2 nous permet d'obtenir le K_m en molarité de substrat.

c. Constante catalytique et constance de spécificité

Les deux autres paramètres utilisés pour caractériser l'interaction protéase/substrat sont la constante catalytique, k_{cat}, et la constante de spécificité, k_{cat} / K_m (Dixon 1964). La constante catalytique, k_{cat}, mesure l'efficacité de l'hydrolyse du substrat par la protéase. Plus elle est grande, plus l'enzyme est efficace pour hydrolyser son substrat. Elle s'exprime en fonction du temps nécessaire pour qu'une molécule d'enzyme hydrolyse une molécule de substrat (s^{-1}). Elle est déterminée à partir de la Vmax et selon l'équation k_{cat} = Vmax/(E), où (E) correspond à la concentration en enzyme (E)]. Ce calcul nécessite que la Vmax soit déterminée avec une enzyme titrée. La constante de spécificité, k_{cat} / K_m, illustre la spécificité globale de la protéase vis-à-vis d'un substrat. Plus il est grand, plus la protéase est spécifique du substrat. Elle s'exprime en ($Mol^{-1}.s^{-1}$).

d. Influence de l'environnement : pH, température, et cofacteurs

L'activité d'une protéase varie selon sa concentration mais également sa localisation dans la cellule ou dans le milieu extracellulaire. Les protéases sont sensibles aux variations de pH, de température, de concentration en certains éléments tels que les sels, les substrats et les cofacteurs de leur environnement.

Pour chaque paramètre, des valeurs optimales d'activité existent, ces valeurs sont dépendantes et spécifiques de chaque protéase. Le pH est l'un des paramètres d'activité les plus importants (Ward, Kerry *et al.* 2012). En effet, les variations de pH changent l'état d'ionisation des acides aminés, et modifient les charges du site actif. Elles peuvent ainsi altérer ou améliorer les interactions protéase-substrat (Figure 13).

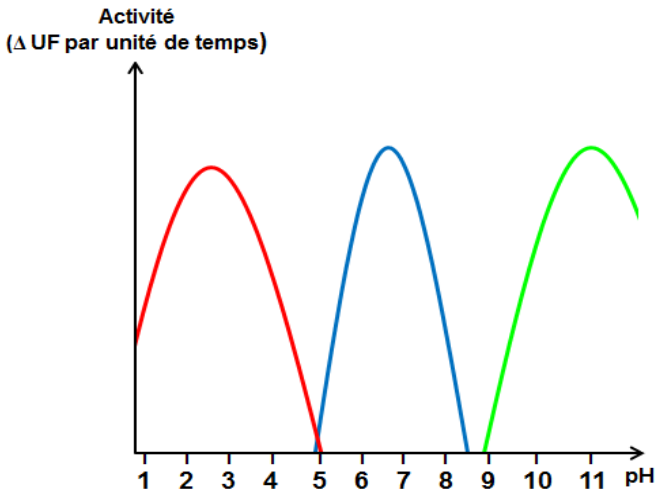


Figure 13 : Influence du pH sur l'activité des protéases

Spectre d'activité de 3 protéases. En rouge une protéase « acide », en bleu une protéase « neutre » et en vert une protéase « basique ». Le spectre d'activité s'étale sur 4 unités de pH mais la zone d'activité maximale est très restreinte. Aucune protéase n'est active de manière équivalente sur tous les pH.

La température est également un facteur qui influence la vitesse de réaction : dans un premier temps, l'augmentation de la température favorise l'activité grâce à un apport d'énergie, qui facilite le clivage. Cependant, au-delà d'un certain seuil, cette augmentation entraîne une dénaturation de la protéase (Bernhard 1969) (Figure 14).

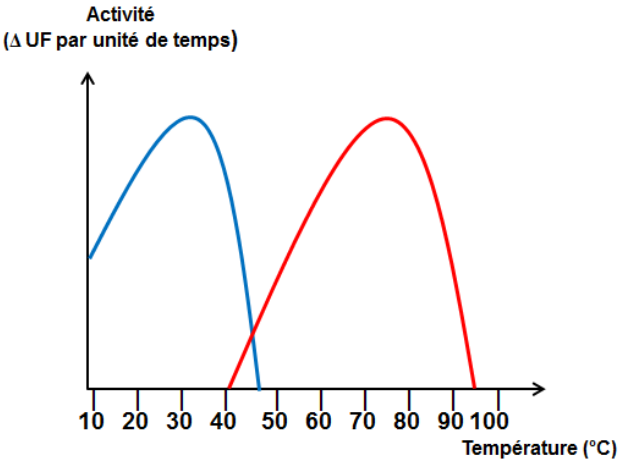


Figure 14 : Influence de la température sur l'activité des protéases

Exemple de l'influence sur deux protéases : la courbe bleue représente une majorité de protéases avec un pic d'activité à 37°C, le rouge représente des protéases d'organismes thermophiles vivants dans des milieux extrêmes où le pic d'activité se trouve pour des températures beaucoup plus élevées.

La présence de sels et de cofacteurs possède un effet similaire à celui de la température. Dans un premier temps leur présence favorise les réactions, cependant un excédant peut conduire à une inhibition de l'activité.

3. Mécanismes d'inhibition.

a. Inhibiteurs compétitifs, incompétitifs et non compétitifs

Un inhibiteur de protéase est une molécule qui va empêcher/arrêter la réaction d'hydrolyse d'une protéase. Leur nature chimique est variable. Les inhibiteurs naturels sont produits par les organismes. Ces inhibiteurs permettent de contrôler l'activation de leurs propres protéases (par exemple inhiber le clivage du pro-domaine des protéases), ou d'inhiber l'action de protéases de pathogènes. Le génome humain code pour près de 1600 inhibiteurs naturels de protéases (MEROPS 2013). Les inhibiteurs de synthèses (peptidiques ou non peptidiques) sont synthétisés par l'homme, et servent souvent d'outils d'étude (Arastu-Kapur, Ponder *et al.* 2008) ou de traitements de pathologie telle que le VIH ou des cancers (Drag and Salvesen 2010). Ces inhibiteurs se différentient par leur mode d'action, il existe 3 grands groupes :

- **Les inhibiteurs compétitifs** : Ils se fixent directement sur l'enzyme libre. Certains de ces inhibiteurs possèdent une homologie structurale avec le substrat, ce sont des inhibiteurs isostériques. Ils interagissent avec le site actif bloquant ainsi la catalyse du substrat (Figure 15). Les inhibiteurs compétitifs peuvent aussi se fixer ailleurs sur la protéase et provoquer un changement de la conformation et empêcher la réaction. Ce sont des inhibiteurs allostériques. D'un point de vue enzymatique, ces inhibiteurs n'altèrent pas la Vmax mais ils diminuent l'affinité de la protéase pour le substrat.

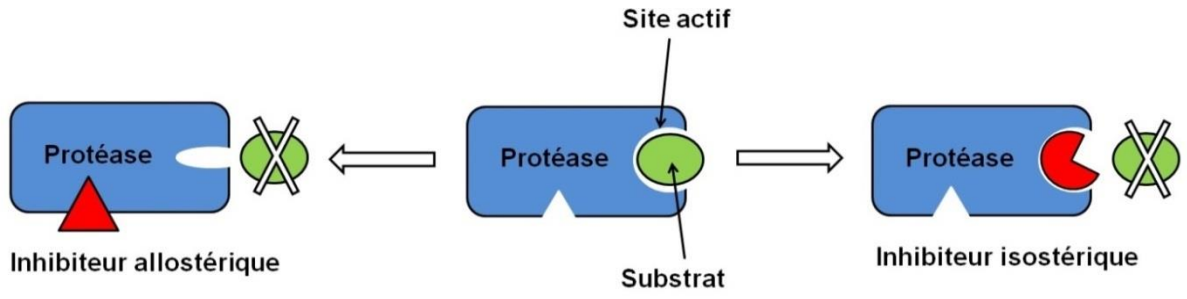


Figure 15: Mode d'action des inhibiteurs compétitifs

Illustration du fonctionnement des inhibiteurs compétitifs qui empêchent l'accès au site actif sans inactiver la protéase. Soit les inhibiteurs se fixent directement au site actif (inhibiteurs isostériques) soit ils entrainent un changement de conformation de celui-ci rendant l'accès du site impossible au substrat (inhibiteurs allostériques)

- **Les inhibiteurs incompétitifs** : Ils se fixent uniquement sur le complexe protéase-substrat. Ils ont un site de fixation qui ne devient accessible que lorsque la protéase interagit

avec le substrat (Figure 16). De par leur fixation, ils empêchent la catalyse d'avoir lieu et bloquent la réaction et le complexe. Ce type d'inhibiteur entraîne une diminution en parallèle de la Vmax et de l'affinité pour le substrat.

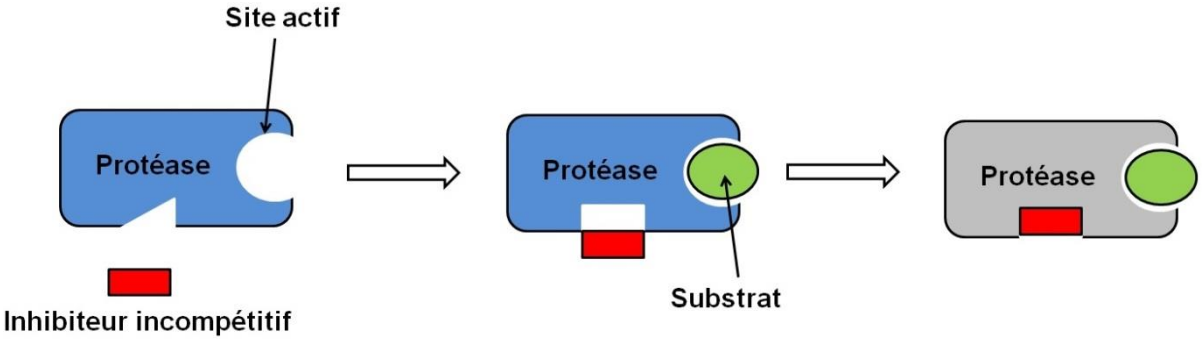


Figure 16 : Mode d'action des inhibiteurs incompétitifs

Illustration du fonctionnement des inhibiteurs incompétitifs. Leur site de fixation n'est accessible que lors de la formation du complexe protéase-substrat. Lors de l'interaction entre celui-ci et la protéase il y a inactivation et blocage du complexe.

- **Les inhibiteurs non compétitifs** : Ils se fixent sur la protéase à un autre site que le site actif et peuvent aussi bien inhiber la protéase seule que le complexe protéase-substrat et cela avec la même affinité (Figure 17). La fixation de l'inhibiteur entraîne un changement de la conformation tridimensionnelle du site actif empêchant la transformation du substrat. Ces inhibiteurs entraînent une chute de la Vmax mais pas de l'affinité de la protéase pour le substrat.

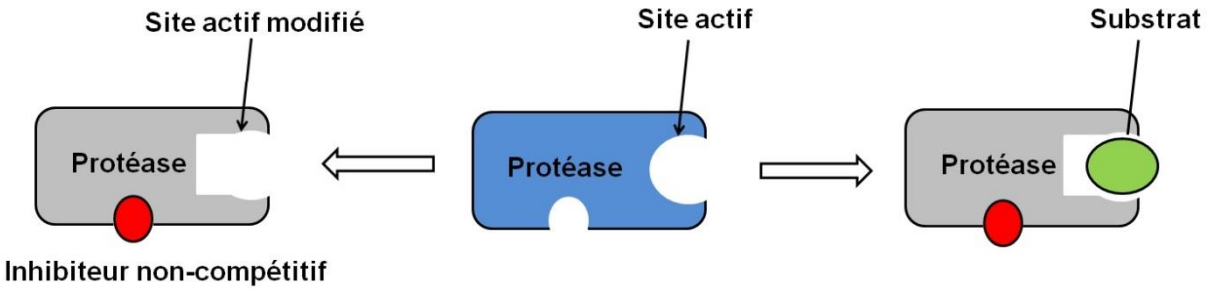


Figure 17 : Mode d'action des inhibiteurs non-compétitifs

Illustration du fonctionnement des inhibiteurs non-compétitifs. Ils se fixent indifféremment sur la protéase seule ou complexée et entrainent une inactivation de celle-ci en modifiant le site actif mais pas le site de reconnaissance.

Il existe deux classes d'inhibiteurs, en fonction de la nature de leur interaction avec leur cible. Le premier type d'interaction est définitif, avec la création d'une liaison covalente, on parle alors d'inhibiteurs irréversibles ; le deuxième type d'interaction est transitoire, on parle alors d'inhibiteurs réversibles.

b. Inhibiteurs irréversibles

Les inhibiteurs irréversibles forment des liaisons covalentes avec les protéases et les inactivent de façon permanente. Les liaisons covalentes formées sont issues de la réaction chimique entre la protéase et l'inhibiteur et sont très fortes en énergie. Ces inhibiteurs ne peuvent être dialysés.

c. Inhibiteurs réversibles

Les inhibiteurs dits réversibles interagissent avec leurs cibles de manière non covalente grâce à des interactions hydrophobes ou des liaisons hydrogène. Ce sont souvent des liaisons de faible énergie et il n'y a pas de réaction chimique entre l'inhibiteur et la protéase. Ceux-ci peuvent généralement être éliminés par dialyse, dilution, ou simplement au cours du temps. L'interaction entre les inhibiteurs réversibles de type compétitif et leur cible est caractérisée par la constante d'inhibition.

d. Constante d'inhibition

L'interaction entre les protéases et leurs inhibiteurs réversibles se caractérise par la spécificité de l'inhibiteur pour la protéase. Cette interaction est caractérisée par le *Ki* ou la constante d'inhibition (Dixon 1953) (Figure 18). Elle correspond à la concentration en inhibiteur pour laquelle la moitié des sites catalytiques sont bloqués. Plus le *Ki* est faible, plus l'affinité de l'inhibiteur pour la protéase est forte.

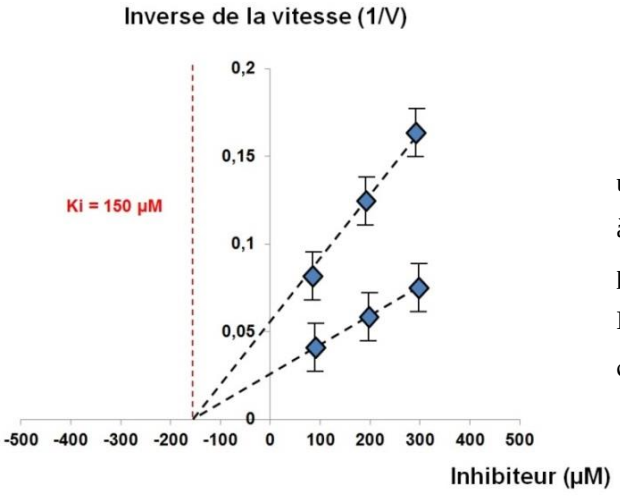


Figure 18 : Détermination du *Ki* d'un inhibiteur

Graphique permettant le calcul du *Ki* d'un inhibiteur pour une enzyme selon la méthode de Dixon. Le *Ki* est calculé à partir de deux concentrations différentes en inhibiteur pour une concentration en enzyme et en substrat fixe. Le Ki est déterminé par le point d'intersection des deux courbes avec l'axe des abscisses.

4. Protéases parasitaires

L'étude des protéases parasitaires a commencé vers les années 1970 avec la découverte que celles-ci étaient non seulement impliquées dans des processus importants mais également qu'elles étaient des cibles thérapeutiques potentielles (Levy, Siddiqui *et al.* 1974).

a. Protéases facteurs de virulence

Les protéases parasitaires sont impliquées dans différents processus clefs des cycles biologiques des parasites : l'entrée et la sortie des cellules, le métabolisme et la croissance, et l'immunomodulation. Du fait de leur implication dans les nombreux processus clefs des cycles parasitaires, elles ont rapidement été considérées comme des facteurs de virulence potentiels (McKerrow, Caffrey *et al.* 2006). Le Tableau 4 regroupe des protéases identifiées dans différents processus clefs comme l'invasion et le métabolisme. Chaque fonction décrite dans ce tableau est illustrée par un exemple plus détaillé.

- **Adhérence à la cellule de l'hôte:**

L'adhérence aux cellules de l'hôte est la première des étapes clefs du développement intracellulaire des parasites. Par exemple, la glycoprotéine de surface majoritaire (MSP/gp63) des *Leishmania spp.* est une métallo-protéase intervenant dans l'adhérence des parasites aux macrophages (Brittingham, Morrison *et al.* 1995) (Figure 19).

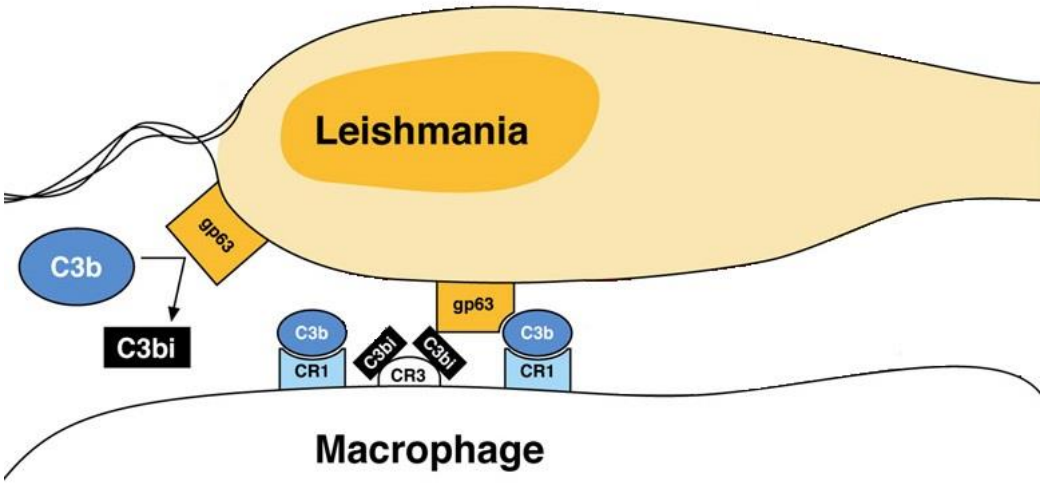


Figure 19 : Implication de la gp63 dans l'adhérence cellulaire de *Leishmania spp*.

La métallo-protéase de surface gp63 clive le facteur du complément C3b, un élément de la réponse immunitaire innée, en facteur C3bi inactivé. La métallo-protéase se fixe au C3b et au C3bi pour interagir avec les récepteurs au complément CR1 et 3 pour adhérer aux macrophages. Adapté de (Bogdan and Rollinghoff 1998)

Cette adhésion est réalisée par l'intermédiaire de l'interaction entre la gp63 parasitaire et le facteur de complément C3b, l'un des principaux élément impliquée dans le système du complément de la réponse immunitaire innée, (Russell 1987). Le facteur C3b permet la mise en place de l'opsonisation, une liaison covalente du facteur C3b sur la totalité de la membrane des pathogènes, ce qui facilite leur phagocytose par les macrophages et cellules dendritiques. Le C3b est également impliqué dans la formation du complexe d'attaque membranaire permettant la lyse des pathogènes par formation de pores dans les membranes. La gp63 hydrolyse le facteur C3b en C3bi, une forme inactive (Yao, Donelson *et al.* 2003). Cette interaction entre gp63 et le facteur du complément C3b intervient au niveau d'un motif spécifique Arg-Gly-Asp de la gp63 (Russell and Wright 1988). Cette conversion du facteur C3b en C3bi facilite l'adhésion du parasite aux récepteurs du complément (CR1 et CR3/Mac-1) des macrophages, tout en empêchant la formation du complexe d'attaque membranaire (Brittingham, Morrison *et al.* 1995; Yao, Donelson *et al.* 2003).

- **L'invasion des cellules de l'hôte:**

La majorité des parasites envahissent de manière active les cellules de leurs hôtes. Parmi les différentes protéases impliquées dans l'invasion, les protéases à cystéine de type « papaïne like » sont très importantes. La cruzipaïne a été la première protéase à cystéine caractérisée comme jouant un rôle clef dans l'invasion des cellules hôtes par les formes infectantes de *Trypanosoma cruzi* (trypomastigotes) (Meirelles, Juliano *et al.* 1992). Cette protéase à cystéine est sécrétée par le parasite et clive des précurseurs de polypeptides plasmatiques (kinines) appelés kininogènes (Del Nery, Juliano *et al.* 1997). Les kinines produites, par le clivage des kininogènes par la cruzipaïne, sont internalisées par les cellules de l'hôte grâce à des récepteurs à la bradykinine (Scharfstein, Schmitz *et al.* 2000). Cette activation des récepteurs conduit, via l'activation de la phospholipase C, à une augmentation transitoire de la concentration intracellulaire en calcium (Ca^{2+}). Cette augmentation calcique entraîne la fusion des lysosomes et l'exocytose. *T. cruzi* pénètre alors activement les cellules par une invagination de la membrane plasmique (Yoshida 2006). Des homologues de la cruzipaïne sont présents chez *T. gondii* (Que, Ngo *et al.* 2002) et *E. tenella* (Rieux, Gras *et al.* 2012).

Fonction	Famille	Espèce	Membre	Référence
Adhésion cellulaire	Protéases à cystéine	*Entamoeaba histolytica*	*Eh*CP112	(Garcia-Rivera, Rodriguez *et al.* 1999)
		Trichomonas vaginalis	Cp30	(Mendoza-Lopez, Becerril-Garcia *et al.* 2000)
	Métallo-protéases	*Leishmania spp.*	Gp63	(Brittingham, Morrison *et al.* 1995)
Invasion	Protéases à cystéine	*Trypanosoma cruzi*	Cruzipaïne	(Yoshida 2006)
		Eimeria tenella	Eimeripaïne	(Rieux, Gras *et al.* 2012)
		Toxoplasma gondii	*Tg*CPL	(Larson, Parussini *et al.* 2009)
	Protéases à sérine	*Trypanosoma cruzi*	POP/Oligopeptidase B	(Yoshida 2006)
		Plasmodium spp.	SUB1	(Withers-Martinez, Suarez *et al.* 2012)
		Babesia divergens	*Bd*SUB1	(Montero, Gonzalez *et al.* 2006)
Métabolisme	Protéases à acide aspartique	*Plasmodium spp.*	Plasmepsines	(Moon, Tyas *et al.* 1997) (Moon, Kang *et al.* 2011)
	Protéases à cystéine	*Plasmodium falciparum*	Falcipaïne	(Subramanian, Hardt *et al.* 2009)
			DPAP1	(Klemba, Gluzman *et al.* 2004)
		Schistosoma mansoni	*Sm*CPB / *Sm*CPL	(Wasilewski, Lim *et al.* 1996)
	Métallo-protéases	*Plasmodium falciparum*	*Pf*A-M1	(Dalal and Klemba 2007) (Harbut, Velmourougane *et al.* 2011)
			*Pf*APP	(Ragheb, Bompiani *et al.* 2009)
			Pf-LAP	(Stack, Lowther *et al.* 2007) (Harbut, Velmourougane *et al.* 2011)
Survie/Développement	Protéases à cystéine	*Toxoplasma gondii*	*Tg*CPC1 / *Tg*CPC2	(Que, Engel *et al.* 2007)
		Trypanosoma brucei	*Tb*CPL	(Steverding, Sexton *et al.* 2012)
		Plasmodium falciparum	Falcipaïne	(Eksi, Czesny *et al.* 2004)
	Métallo-protéase	*Plasmodium falciparum*	*Pf*MetAP	(Chen, Xie *et al.* 2009)
			*Pf*A-M1	(Allary, Schrevel *et al.* 2002) (Ragheb, Dalal *et al.* 2011)
Sortie de la cellule hôte	Protéases à sérine	*Plasmodium falciparum*	*Pf*SUB1	(Arastu-Kapur, Ponder *et al.* 2008)
	Protéases à cystéine	*Plasmodium falciparum*	DPAP3	(Arastu-Kapur, Ponder *et al.* 2008)
Immunomodulation	Protéases à cystéine	*Leishmania spp.*	*L*-CPL	(Silva-Almeida, Pereira *et al.* 2012)
	Protéases à sérine	*Trypanosoma cruzi*	Oligopeptidase B	(Swenerton, Zhang *et al.* 2011)

Tableau 4 : Tableau non exhaustif des différentes protéases impliquées dans les processus clefs des cycles parasitaire

➢ **Le métabolisme:**

Pour illustrer l'implication des protéases dans le métabolisme, nous allons nous intéresser à la dégradation de l'hémoglobine par *P. falciparum.* Ce processus met en jeu une douzaine de protéases (Dalal and Klemba 2007; Moon, Kang *et al.* 2011; Rosenthal 2011; McGowan 2013) (Figure 20). Trois familles de protéases sont impliquées dans la dégradation de l'hémoglobine : les protéases à cystéine, les protéases à acide aspartique et les métallo-protéases.

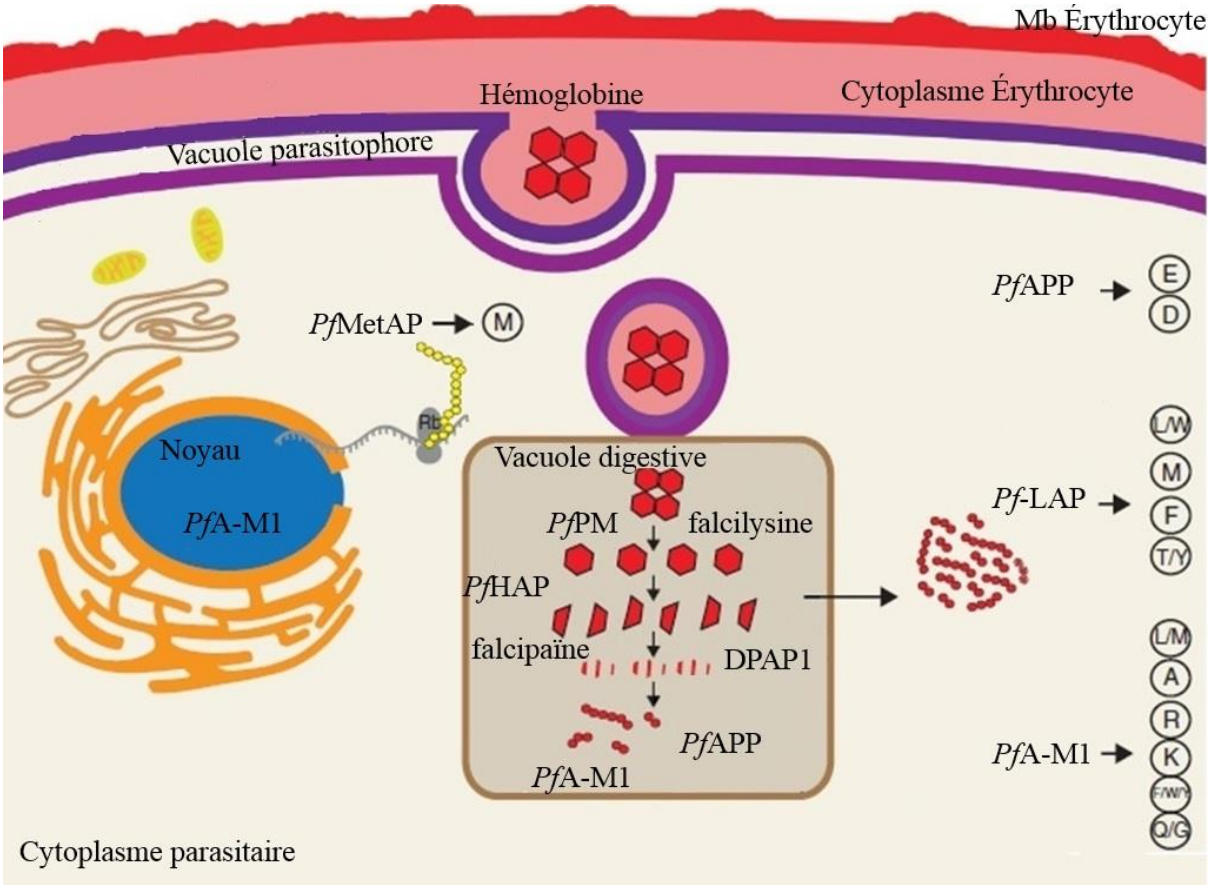


Figure 20 : Implication des protéases dans le métabolisme et le développement de *P. falciparum*

Schéma récapitulatif des protéases impliquées dans la dégradation de l'hémoglobine initiée dans la vacuole digestive par les plasmepsines (*Pf*PMI, II et IV et *Pf*HAP), poursuivie par la falcilysine, les falcipaïnes 2 ,2' et 3, DPAP1, *Pf*APP et *Pf*A-M1. Après la génération de peptides à partir de l'hémoglobine, ceux-ci sont exportés dans le cytoplasme où *Pf*A-M1, *Pf*APP et *Pf*LAP génèrent des acides aminés libres à partir de ces peptides. *Pf*A-M1 semble également impliquée dans le développement de par sa localisation nucléaire et les *Pf*M et AP sont impliquées dans la suppression de la première méthionine (M) des protéines néo-synthétisées. Mb = membrane. Adapté de (McGowan 2013).

La dégradation de l'hémoglobine a majoritairement lieu dans un compartiment parasitaire spécialisé, la vacuole digestive, qui possède un pH acide. Les premières protéases

à intervenir sont les protéases à acide aspartique : les plasmepsines (*Pf*PM). Chez *P. falciparum*, trois plasmepsines et une histo-aspartic protéase (*Pf*HAP) sont impliquées dans la dégradation de l'hémoglobine (Moon, Tyas *et al.* 1997; Moon, Kang *et al.* 2011). *Pf*PM1 et *Pf*PM2 initient la dégradation en hydrolysant la molécule d'hémoglobine en larges fragments (Goldberg, Slater *et al.* 1991; Gluzman, Francis *et al.* 1994). Ces fragments d'hémoglobine sont ensuite hydrolysés par des protéases à cystéine (falcipaïne 2, 2' et 3, DPAP1) et des métallo-protéases (falcilysine, *Pf*APP et *Pf*A-M1) (Klemba, Gluzman *et al.* 2004; Ragheb, Bompiani *et al.* 2009; Subramanian, Hardt *et al.* 2009; Ragheb, Dalal *et al.* 2011).

Les peptides obtenus par clivages de l'hémoglobine dans la vacuole digestive sont finalement transportés dans le cytoplasme du parasite pour y être dégradés en acides aminés libres qui serviront au métabolisme parasitaire (Kolakovich, Gluzman *et al.* 1997). Trois métallo-protéases participent à cette étape finale de la dégradation de l'hémoglobine : une aminopeptidase N (*Pf*A-M1) (Ragheb, Dalal *et al.* 2011), une leucyl-aminopeptidase (*Pf*-LAP) (Harbut, Velmourougane *et al.* 2011) et une aminopeptidase P (*Pf*APP) (Ragheb, Bompiani *et al.* 2009).

- **La survie intracellulaire, le développement parasitaire et la production d'oocyste:**

Il est intéressant d'observer que des protéases possèdent plusieurs fonctions au sein d'un même organisme. Chez *P. falciparum*, *Pf*A-M1 est impliquée dans le métabolisme au sein de la vacuole digestive et du cytoplasme (Allary, Schrevel *et al.* 2002; Azimzadeh, Sow *et al.* 2010; Ragheb, Dalal *et al.* 2011). Outre ces deux localisations**,** *Pf*A-M1 a été localisée dans le noyau du parasite (Dalal and Klemba 2007; Azimzadeh, Sow *et al.* 2010) (Figure 20). Cela suggère que, comme les protéases homologues végétales et animales impliquées dans le cycle cellulaire et le développement (Hosein, Bandyopadhyay *et al.* 2010; Saxena, Rai *et al.* 2010; Peer 2011), *Pf*A-M1 joue également un rôle dans le développement parasitaire (Ragheb, Dalal *et al.* 2011). Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation du développement parasitaire par *Pf*A-M1 restent encore à élucider. Trois autres protéases sont également impliquées dans le développement de *P. falciparum*, deux métallo-protéases de type méthionine aminopeptidases (*Pf*MetAP 1 et 2) (Chen, Chong *et al.* 2006; Chen, Xie *et al.* 2009) et une cystéine protéase, la falcipaïne-1 (Eksi, Czesny *et al.* 2004). Il a été émis l'hypothèse que les *Pf*MetAP, comme leurs homologues d'*Escherichia coli*, interviendraient dans la d'hydrolyse de la méthionine N-terminale des protéines néo-synthétisées, la première étape essentielle de la maturation des protéines (McGowan 2013)

(Figure 20). La falcipaïne-1 a été identifiée par l'utilisation d'inhibiteurs comme impliquée dans la production d'oocystes (Eksi, Czesny *et al.* 2004). Cependant, comme pour *Pf*A-M1, les mécanismes moléculaires impliqués pour ces deux autres protéases ne sont pas encore connus.

- **Sortie de la cellule hôte:**

La sortie des parasites des cellules de l'hôte après leur multiplication fait également appel à un grand nombre de protéases comme par exemple la sortie des mérozoïtes de *P. falciparum* des érythrocytes. Cette sortie, également appelée « egress », est dépendante de protéases à cystéine, à sérine et à acide aspartique (Arastu-Kapur, Ponder *et al.* 2008) (Figure 21).

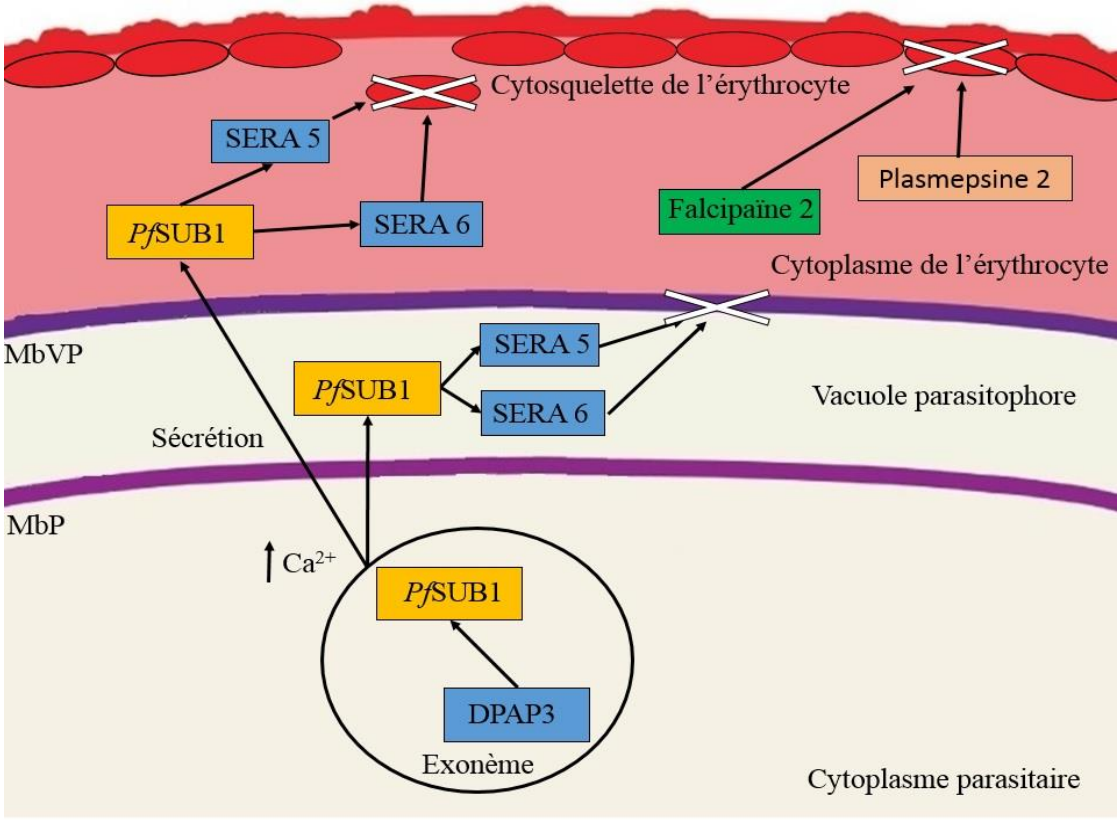


Figure 21 : Implication des protéases dans l' « egress » de *P. falciparum*

DPAP3 mature *Pf*SUB1 dans les exonèmes. Une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} entraine la sécrétion du *Pf*SUB1 qui mature les SERA 5 et 6. Les SERA 5 et 6 dégradent le cytosquelette de l'érythrocyte et la membrane de la vacuole parasitophore (MbPV). La falcipaïne 2 et la plasmepsine 2, participent également à la dégradation du cytosquelette de l'érythrocyte. (MbP : Membrane du parasite). Figure crée à partir des données de la littérature

L'initiation de la rupture de l'érythrocyte est liée à la maturation d'une protéase à sérine de type subtilisine, *Pf*SUB1, par une protéase à cystéine, la dipeptidyl aminopeptidase 3 (DPAP3) dans les exonèmes, un compartiment apical des mérozoïtes (Arastu-Kapur, Ponder *et al.* 2008). Sous l'action d'une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+}, la forme active de *Pf*SUB1 est libérée par les mérozoïtes dans la vacuole parasitophore et dans l'espace entre la membrane de l'érythrocyte et celle du schizonte (Agarwal, Singh *et al.* 2013). Une fois dans la vacuole *Pf*SUB1 mature des protéases à cystéine appelées « serine repeat antigen » ou SERA 5 et 6 (Arastu-Kapur, Ponder *et al.* 2008; Ruecker, Shea *et al.* 2012). Une fois actives, les SERA 5 et 6 participent à la dégradation du cytosquelette de l'érythrocyte et entraînent une perte de l'intégrité membranaire facilitant la libération des mérozoïtes de *P. falciparum* (Millholland, Chandramohanadas *et al.* 2011). La dégradation du cytosquelette fait également intervenir une protéase à cystéine, la falcipaïne 2, et une protéase à acide aspartique, la plasmepsine 2 (Le Bonniec, Deregnaucourt *et al.* 1999; Dhawan, Dua *et al.* 2003; Moura, Dame *et al.* 2009; Millholland, Chandramohanadas *et al.* 2011). D'autres protéines comme des « pores-forming » protéines sont également impliquées dans la rupture de l'érythrocyte (Millholland, Chandramohanadas *et al.* 2011).

- **Immunomodulation**

L'immunomodulation est un procédé utilisé par les parasites pour échapper aux défenses immunitaires de leurs hôtes. Les parasites du genre *Leishmania spp*, réalisent un véritable détournement du système immunitaire en inhibant les voies de signalisation de l'interleukine-12 (IL-12) et de l'oxyde nitrique synthase (NO synthase), tout en recrutant des cellules phagocytaires qui leur serviront d'hôte (Silva-Almeida, Pereira *et al.* 2012) (Figure 22).

La première protéase à intervenir est la métallo-protéase gp63. La gp63, majoritairement exprimée à la surface des parasites *Leishmania spp*., a une action directe sur la réponse immunitaire en inactivant le facteur de complément C3b et en empêchant la formation du complexe d'attaque membranaire comme décrit précédemment dans le paragraphe « processus d'adhésion » (Brittingham, Morrison *et al.* 1995). De plus, la gp63 est également sécrétée (Contreras, Gomez *et al.* 2010). Elle pénètre dans les cellules phagocytaires de l'hôte et interagit directement avec les facteurs de transcription « nuclear factor-kappa B » (Nf-κB) et « activator protein 1 » AP-1 (Gregory, Godbout *et al.* 2008; Contreras, Gomez *et al.* 2010). Le clivage de la forme p65 de Nf-κB par la gp63 génère une forme spécifique de 35 kDa (p35) qui entraîne la transcription des gènes codant pour les chimiokines « macrophage

inflammatory protein » (MIP)-1β et MIP-2 qui favorisent le recrutement des cellules phagocytaires (Gregory, Godbout *et al.* 2008).

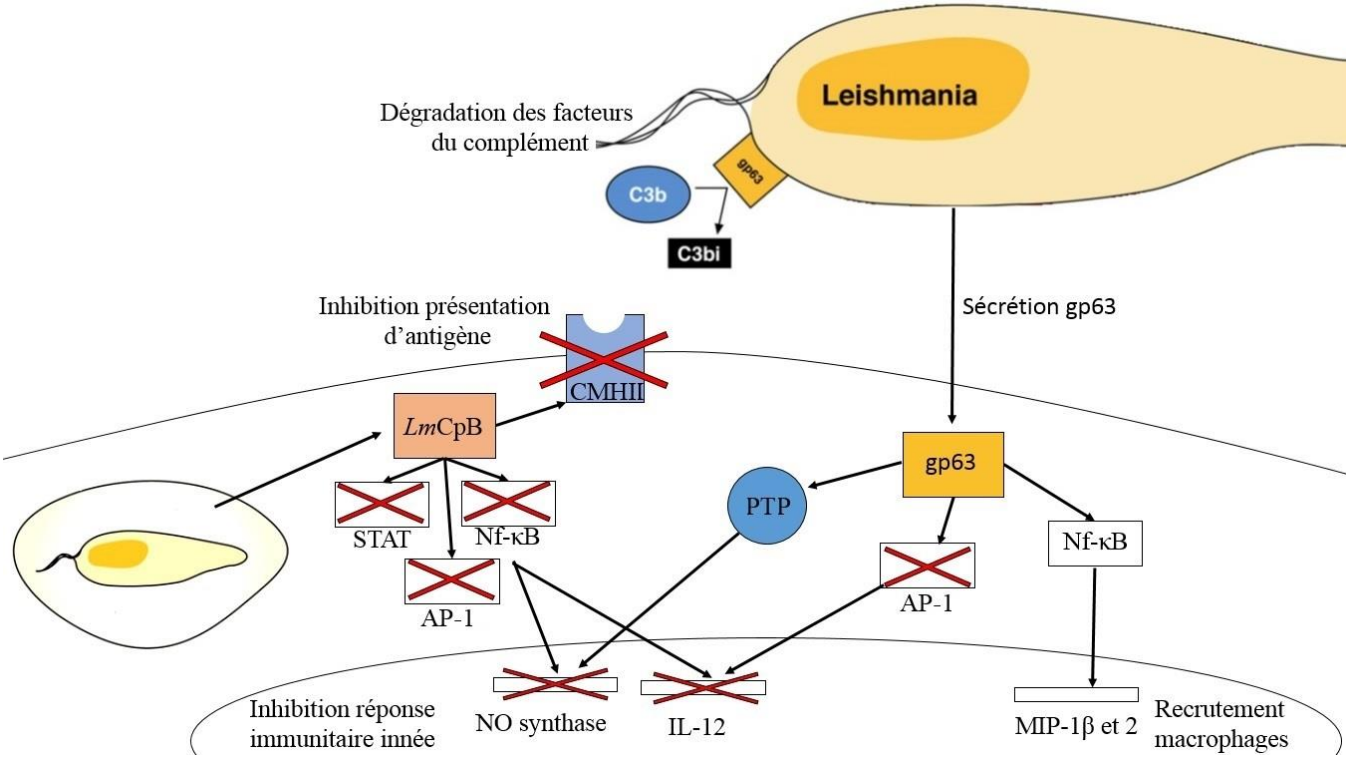


Figure 22 : Implication des protéases dans l'immunomodulation des *Leishmania spp.*

Les *Leishmania spp.* clivent le facteur du complément C3b et l'inactive grâce à la métallo-protéase gp63. Avant d'envahir, elles sécrètent de la gp63 dans les macrophages. La gp63 active les protéines tyrosines phosphatases (PTP), ce qui provoque une inhibition de la transcription de la NO synthase. La gp63 inactive également le facteur de transcription AP-1 ce qui inhibe la production d'IL-12. La gp63 active de plus, via une modification de Nf-κB, la transcription des chimiokines MIP-1β et 2 ce qui favorise le recrutement d'autres macrophages. Après avoir envahi le macrophage, les *Leishmania spp.* sécrètent des homologues de cathepsines B (*Lm*CpB) qui inhibent les facteurs de transcription STAT-1α, Nf-κB et AP-1 renforçant l'inhibition de la réponse immunitaire innée. La *Lm*CpB clive également les CMH de classe II (CMH II) inhibant ainsi la présentation d'antigène par le macrophage infecté. Figure crée à partir des données de la littérature

En revanche, le clivage d'AP-1 empêche la transcription de l'interféron-γ, de l'IL-12 (Contreras, Gomez *et al.* 2010). La gp63 inhibe également la production de monoxyde d'azote radicalaire ou oxyde nitrique (NO) par l'activation des protéines tyrosines phosphatases (PTP) (Lieke, Nylen *et al.* 2008; Gomez, Contreras *et al.* 2009). Après avoir désactivé les réponses immunitaires des macrophages, les *Leishmania spp.* clivent un de leur antigène parasitaire de surface, l'énolase. Ce clivage est réalisé par une sérine protéase, l'oligopeptidase B

empêchant la reconnaissance du parasite par le macrophage, qui ne sera pas activé, lors de l'invasion (Swenerton, Zhang *et al.* 2011). Une fois l'invasion effectuée, les *Leishmania spp.* sécrètent une protéase à cystéine, une cathepsine B, *Lm*CpB, qui inhibe l'activation des voies Nf-κB, « signal transducers and activators of transcription » (STAT-1α) et AP-1 empêchant toute production d'IL-12 ou de NO (Abu-Dayyeh, Hassani *et al.* 2010). L'absence de production d'IL-12 ne permet pas l'activation et de développement d'une réponse inflammatoire par la production d'interféron-γ et de « tumor necrosis factor »-α. *Lm*CpB entraîne aussi la dégradation du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) impliqué dans la présentation des antigènes (De Souza Leao, Lang *et al.* 1995). Ainsi, les protéases de *Leishmania spp*. bloquent les voies de production de l'IL-12 et du NO, échappent au système immunitaire et, en parallèle, entraînent via la sécrétion des MIPs le recrutement d'autres cellules phagocytaires nécessaires pour leur multiplication.

b. Protéases, cibles thérapeutiques potentielles

L'identification ou la vérification de l'implication des protéases dans des évènements clefs des cycles parasitaires (invasion, métabolisme,…) fait généralement appel à des inhibiteurs de protéases. Les premières études sont majoritairement réalisées *in vitro*. Le Tableau 5 ci-dessous résume les différentes familles de protéases qui ont été mises en évidence *in vitro* par l'usage d'inhibiteurs comme impliquées dans des processus clefs des cycles parasitaires décrit précédemment

.

Famille de protéase cible	Processus inhibé	Inhibiteurs	Parasites	Références
Sérine	Invasion	Ni*	*Schistosoma cercariae*	(Lim, Sun *et al.* 1999)
		TLCK/TPCK	*Babesia divergens*	(Montero, Rafiq *et al.* 2007)
		AEBSF	*Toxoplasma gondii*	(Conseil, Soete *et al.* 1999)
	Sortie	Ni*	*Plasmodium falciparum*	(Arastu-Kapur, Ponder *et al.* 2008)
Cystéine	Invasion	Ni*	*Toxoplasma gondii*	(Larson, Parussini *et al.* 2009)
			Trypanosoma cruzi	(Meirelles, Juliano *et al.* 1992)
		Leupeptine	*Plasmodium*	(Dluzewski, Rangachari *et al.* 1986)
		CA074	*Eimeria tenella*	(Rieux, Gras *et al.* 2012)
	Métabolisme	Ni*	*Plasmodium falciparum*	(Rosenthal, Olson *et al.* 1996)
		E64	*Plasmodium falciparum*	(Rosenthal, McKerrow *et al.* 1988)
	Survie/Développement	Ni*	*Trypanosoma cruzi*	(Meirelles, Juliano *et al.* 1992)
		E64	*Plasmodium falciparum*	(Eksi, Czesny *et al.* 2007)
			Babesia bovis	(Okubo, Yokoyama *et al.* 2007)
			Trypanosoma congolense	(Mbawa, Gumm *et al.* 1992)
	Sortie	Ni*	*Plasmodium falciparum*	(Dhawan, Dua *et al.* 2003) (Arastu-Kapur, Ponder *et al.* 2008)
Aspartyl	Métabolisme	Ni*	*Plasmodium falciparum*	(Francis, Gluzman *et al.* 1994) (Silva, Lee *et al.* 1996)
Métallo-protéase	Développement	Ni*	*Plasmodium falciparum*	(Flipo, Florent *et al.* 2003) (Flipo, Beghyn *et al.* 2007)
		Bestatine	*Plasmodium spp.*	(Nankya-Kitaka, Curley *et al.* 1998)
		Fumagilline	*Plasmodium falciparum*	(Chen, Xie *et al.* 2009)
	Métabolisme	Ni*	*Plasmodium falciparum*	(Harbut, Velmourougane *et al.* 2011) (Velmourougane, Harbut *et al.* 2011)

Tableau 5 : Tableau non exhaustif des effets de différents inhibiteurs sur les cycles de vie parasitaires

Ni* sont des inhibiteurs non commercialisés, spécialement synthétisés pour inhiber les protéases d'intérêt.

D'une manière intéressante, certains inhibiteurs ont même montré la capacité *in vivo* de lutter contre les maladies parasitaires (Tableau 6).

Famille de protéases ciblées	Parasite	Organisme	Références
Cystéine	*Plasmodium spp.*	Souris	(Rosenthal, Lee *et al.* 1993) (Olson, Lee *et al.* 1999)
	Leishmania spp.	Souris	(Selzer, Pingel *et al.* 1999)
	Trypanosoma spp.	Souris Chien Primates	(Engel, Doyle *et al.* 1998) (Barr, Warner *et al.* 2005) (McKerrow, Doyle *et al.* 2009) (Chen, Brinen *et al.* 2010) (Mallari, Zhu *et al.* 2010)
	Schistosoma spp.	Souris	(Wasilewski, Lim *et al.* 1996)
Métallo-protéase	*Plasmodium spp.*	Souris	(Chen, Xie *et al.* 2009) (Skinner-Adams, Peatey *et al.* 2012)
Aspartyl	*Plasmodium spp.*	Souris	(Andrews, Fairlie *et al.* 2006)
	Cryptosporidium parvum	Souris	(Mele, Gomez Morales *et al.* 2003)
	Toxoplasma gondii	Humain*	(Alfonso and Monzote 2011)
	Leishmania spp.		
Sérine	*Toxoplasma gondii*	Souris	(Buitrago-Rey, Olarte *et al.* 2002)

Tableau 6 : Tableau non exhaustif des inhibitions *in vivo* des cycles parasitaires par des inhibiteurs de protéases

*Chez l'homme, il a été mis en évidence une forte chute du taux d'infection à *Toxoplasma gondii* et *Leishmania spp.* pour des patients traités avec des inhibiteurs de protéases virales (Alfonso and Monzote 2011).

De ce fait, les protéases ont rapidement été considérées comme des cibles thérapeutiques potentielles de choix (McKerrow 1999; McKerrow, Engel *et al.* 1999; Skinner-Adams, Stack *et al.* 2010; Trenholme, Brown *et al.* 2010). Cependant, afin de cibler précisément les protéases parasitaires, de nombreux inhibiteurs spécifiques ont été synthétisés (Tableau 5 Ni*).

C. Utilisation d'inhibiteur de protéases comme antiparasitaire

Du fait de l'apparition croissante, chez de nombreuses espèces parasitaires, de souches résistantes aux drogues commercialisées (Murta, Gazzinelli *et al.* 1998; Mita and Tanabe 2012), les inhibiteurs de protéases sont considérés comme un moyens de lutte alternatif.

a. Recherche et développement d'inhibiteurs

Le processus de développement des inhibiteurs se déroule en plusieurs étapes (Renslo and McKerrow 2006).

-1 : Identification de la famille et de la cible avec des inhibiteurs commerciaux.

-2 : Recherche d'inhibiteurs plus spécifiques de la protéase cible.

-3 : Vérification des effets *in vitro* sur le développement du parasite.

-4 : Pharmaco-modulations et tests *in-vivo*.

Nous allons prendre l'exemple de K777 ou K11777, un inhibiteur de protéases à cystéine ciblant la cruzipaïne, une protéase à cystéine de *T. cruzi* (Figure 23). A l'heure actuelle, c'est le seul inhibiteur de protéase ciblant une maladie parasitaire ayant atteint la phase de tests cliniques sur l'homme (Doyle, Zhou *et al.* 2011).

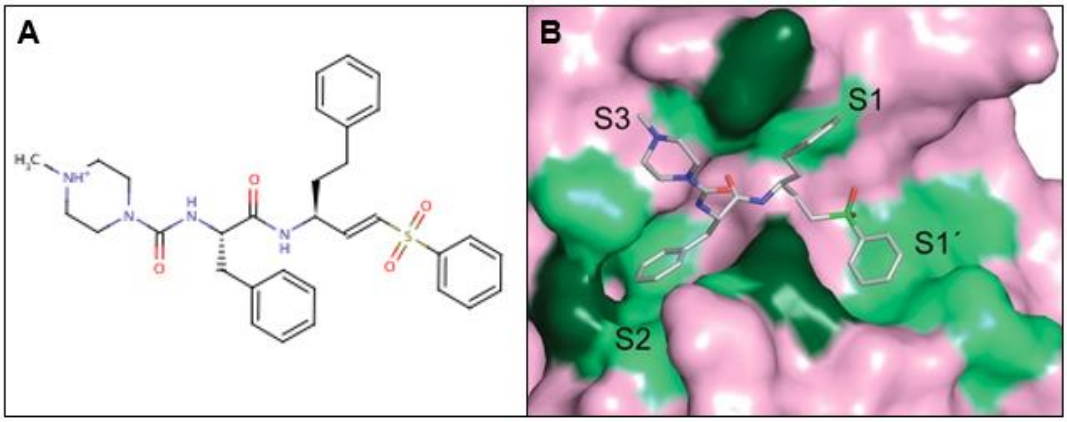


Figure 23 Le K11777 inhibiteur de la cruzipaïne

A, Structure du K11777. *B*, Modélisation 3D de l'interaction entre le K11777 et la cruzipaïne. Les région hydrophobe sont représentées en vert clair, et les résidus polaires qui interagissent avec l'inhibiteur par leur liaison C-C non polaire sont en vert foncé (Kerr, Lee *et al.* 2009)

Il est tout d'abord nécessaire d'identifier les protéases cibles d'intérêt. En ce qui concerne *Trypanosoma spp.*, les inhibiteurs utilisés sont des inhibiteurs commerciaux, la leupeptine et l'E64, ont permis de mettre en évidence l'existence d'une activité de type protéase à cystéine chez ces parasites (Rautenberg, Schadler *et al.* 1982; Cazzulo, Couso *et al.* 1989; Pamer, So *et al.* 1989). C'est en 1990 que la protéase responsable de cette activité est identifiée et nommée cruzipaïne (Cazzulo, Cazzulo Franke *et al.* 1990). Afin d'obtenir des inhibiteurs plus spécifiques de la cruzipaïne, de nouveaux inhibiteurs (non commerciaux) sont testés contre l'activité de la protéase et au cours du cycle du parasite *in vitro*. Une famille d'inhibiteurs se démarque pour son efficacité : les vinyl-sulfones (Meirelles, Juliano *et al.* 1992). Ces vinyl-sulfones ont donc été sélectionnées comme structure de base. Dans le cas du K11777 Engel *et al.* on testé une banque de molécules contenant des vinyl-sulfones provenant d'une compagnie pharmaceutique développant des inhibiteurs de protéase dans le cadre de la lutte contre l'ostéoporose, et ils ont observé que cet inhibiteur permet de traiter *in vivo* une infection de *T. cruzi* chez la souris (Engel, Doyle *et al.* 1998). Quelques années plus tard, le K11777 est en phase de tests précliniques pour le traitement des infections par *Trypanosoma spp*. et montre des effets protecteurs sur des chiens infectés par *T. cruzi* (Barr, Warner *et al.* 2005), puis sur des primates (McKerrow, Doyle *et al.* 2009). Ce composé est maintenant entré dans la phase 1 des tests cliniques chez l'homme (Doyle, Zhou *et al.* 2011). Depuis, d'autres travaux sur K11777 ont été effectués avec des modifications structurales du composé (Chen, Brinen *et al.* 2010), le but étant d'augmenter la sélectivité de l'inhibiteur pour la protéase cible tout en augmentant sa solubilité, sa stabilité *in vivo* et en diminuant sa toxicité. Le design de nouveaux inhibiteurs est maintenant très couramment assisté par l'informatique. La sélection à partir de la modélisation tridimensionnelle des protéases, accélère l'étape de modification (Li, Chen *et al.* 1996; McGowan, Oellig *et al.* 2010).

b. Utilisation en tant que traitement

Les preuves de concepts de l'utilisation des inhibiteurs de protéases contre les maladies parasitaires ont été réalisées par les équipes des docteurs McKerrow, Goldberg et Rosenthal (McKerrow, Engel *et al.* 1999; Rosenthal, Sijwali *et al.* 2002; McKerrow, Rosenthal *et al.* 2008; Meyers and Goldberg 2012). Cependant, à l'heure actuelle, il n'y a pas d'inhibiteur de protéases antiparasitaire ou même vétérinaire sur le marché. Ces inhibiteurs sont toujours en développement comme illustré avec le K11777 qui est le premier à atteindre une phase de développement aussi avancée (Abbenante and Fairlie 2005). Concernant les maladies

parasitaires vétérinaires, le processus de développement d'inhibiteur en est à l'étape d'identification de protéases et de recherche d'inhibiteurs spécifiques pour *Eimeria spp.*, *Neospora spp.*, *Cryptosporidium spp.*, *Babesia spp.* et *Haemonchus spp.* (Mele, Gomez Morales *et al.* 2003; Naguleswaran, Muller *et al.* 2003; Muleke, Ruofeng *et al.* 2006; Okubo, Yokoyama *et al.* 2007; Rieux, Gras *et al.* 2012; Wang, Zhang *et al.* 2013).

Dans la mesure où le K11777 est initialement issu de banque d'inhibiteurs de protéases utilisés dans la lutte contre l'ostéoporose, il est intéressant de regarder les effets des inhibiteurs de protéase en tant que traitement de maladies non parasitaires telles que les cancers ou le HIV sur les maladies parasitaire. Le développement des inhibiteurs passent par plusieurs étapes de sélections avec des phases précliniques et cliniques (Figure 24). Une très grande majorité des inhibiteurs synthétisés dans le but de servir à produire des traitements (plus de 98%), sont rejetés dans les phases précliniques, le test de plusieurs milliers de molécules conduisant généralement à la sélection de quelques molécules pour les phases cliniques seulement.

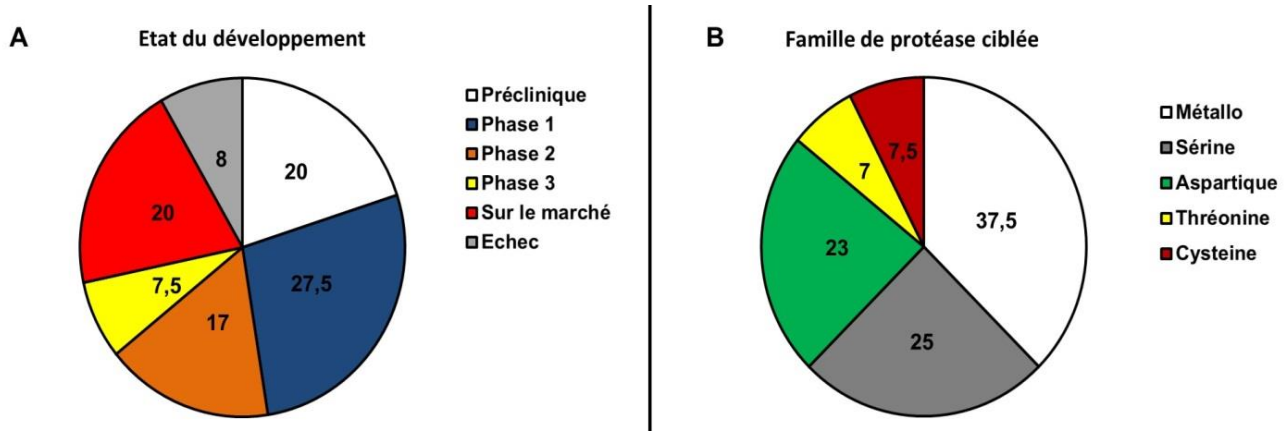


Figure 24 : État de développement des inhibiteurs de protéases comme traitement des maladies humaines

A : Statuts des différents inhibiteurs de protéases dans leurs étapes de développement, exprimés en % (120 molécules). Le pourcentage d'échec reprend le nombre de molécule ayant était abandonnée pendant les phases cliniques, si il tenait compte de l'ensemble de phase et notamment préclinique, celui-ci serai de près de 98%.

B : Classement des inhibiteurs de protéases développés en fonction de la famille ciblée, exprimé en % (120 molécules). Adapté de (Abbenante and Fairlie 2005).

Cette sélection est réalisée sur les propriétés de l'inhibiteur : sa spécificité (force d'interaction avec la protéase cible), sa sélectivité (préférence pour la protéase cible et non les homologues de l'hôte) mais également sur sa biodisponibilité (capacité à être accessible *in vivo* pour inhiber la protéase cible), sa stabilité *in vivo* (capacité à rester actif malgré l'action de l'organisme hôte sur l'inhibiteur), sa toxicité (présence ou non d'effets secondaires) (Drag and

Salvesen 2010). Il est important de noter que les chiffres illustré en figure 24 B, varie d'année en année certaines nouvelles pistes étant explorée grâce à l'avancée des connaissances sur l'implication des protéases dans certaines pathologies et d'autres abandonnée dues par exemple aux effets secondaires (Overall and Kleifeld 2006; Palermo and Joyce 2008). Les inhibiteurs de protéases sont développé contre différents types de maladies, avec plusieurs inhibiteurs pouvant être utilisés dans le cadre de la lutte contre une seul maladie, par exemple 9 inhibiteurs d'aspartyl-protéase sont commercialisés mais tous dans le cadre de la lutte contre le HIV (Table 7).

Famille ciblée	**Maladies**	**Nombre d'inhibiteur sur le marché**
Métallo-protéase	Hypertension	11
	Ostéoarthrose	1
	Péritonite	1
	Maladies péridontales	1
Aspartyl	VIH	9
Sérine	Thrombose	2
	Pancréatite	1
Thréonine	Myélome	1
Cystéine	-	0

Tableau 7 : Tableau des inhibiteurs de protéases commercialisés en 2005

Adapté de (Abbenante and Fairlie 2005).

Parmi les 8 différentes maladies traitées avec des inhibiteurs de protéases l'exemple du VIH est le plus intéressant pour l'effet des inhibiteurs d'aspartyl-protéases utilisée dans la trithérapie sur des parasites (Abbenante and Fairlie 2005; Andrews, Fairlie *et al.* 2006; Redmond, Skinner-Adams *et al.* 2007; Alfonso and Monzote 2011).

Avec 35,3 millions de personnes infectées, le VIH est l'une des plus importantes maladies de ce siècle à l'échelle mondiale (O.M.S. 2013). En tout, 9 inhibiteurs de protéases sont couramment utilisés dans le cadre du traitement du VIH. Tous ces inhibiteurs ciblent une protéase à acide aspartique, la VIH-1 protéase (Abbenante and Fairlie 2005). Avec 10 millions de personnes traitées dans le monde, l'efficacité des inhibiteurs de protéases sur le

VIH a été plus que prouvée dans la mesure où ils sont toujours conseillés par l'Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S. 2013).

Les données qui nous intéressent concernent les effets des traitements à base d'inhibiteurs de protéases du VIH sur d'autres maladies non virales. De nombreuses études ont montré que les inhibiteurs utilisés dans le traitement du VIH avaient des effets contre le cancer mais également des maladies parasitaires (Tableau 8). Des effets des inhibiteurs de protéases à acide aspartique, utilisés dans la lutte contre le VIH, sont observés sur 4 parasites (*Toxoplasma, Plasmodium Cryptosporidium* et *Leishmania*) *in vitro* et *in vivo*.

Type de maladie	Nom précis	Références
Cancer	Sarcome de Kaposi	(Cattelan, Calabro *et al.* 1999)
	Cancer du sein	(Shim, Rao *et al.* 2012)
	Hépato-carcinome	(Sun, Niu *et al.* 2012)
	Lymphome	(Kariya, Taura *et al.* 2013)
Parasitaire	*Plasmodium falciparum*	(Andrews, Fairlie *et al.* 2006) (Redmond, Skinner-Adams *et al.* 2007) (Hobbs, Tanaka *et al.* 2013)
	Cryptosporidium parvum	(Mele, Gomez Morales *et al.* 2003)
	Toxoplasma gondii	(Monzote, Rodriguez *et al.* 2013)
	Leishmania spp.	(Valdivieso, Rangel *et al.* 2010) (Demarchi, Silveira *et al.* 2012) (van Griensven, Diro *et al.* 2013)

Tableau 8 : Tableau non exhaustif des maladies impactées par les inhibiteurs de protéases utilisées dans le cadre du traitement contre le VIH

Il a également été décrit que, en Europe, lors de la mise en place des inhibiteurs de protéases dans la trithérapie contre le VIH, les cas de co-infection VIH-*Leishmania* et d'encéphalite toxoplasmique ont drastiquement diminué, les auteurs suggérant un effet direct des inhibiteurs utilisés en trithérapie sur les parasites (Valdivieso, Rangel *et al.* 2010; Alfonso and Monzote 2011; Demarchi, Silveira *et al.* 2012). De plus, les effets sur *Cryptosporidium parvum* indiquent que les traitements à base d'inhibiteur de protéases pour l'humain pourraient potentiellement également être utilisé comme base pour le traitement de maladies parasitaires vétérinaires (Mele, Gomez Morales *et al.* 2003).

c. Risques potentiels : Toxicité et résistance

L'un des points cruciaux de l'utilisation d'inhibiteurs de protéases comme traitement est le risque de toxicité. En effet, les inhibiteurs peuvent être efficaces contre les protéases du parasite mais également contre celles de l'hôte.

Un premier élément de réponse est que les inhibiteurs de protéases sont utilisés avec succès pour lutter contre l'infection par le VIH chez l'homme et ne présentent pas d'effets néfastes majeurs. Les effets secondaires actuels des inhibiteurs de protéases contre le VIH qui peuvent se déclarer sont : une augmentation des lipides et des sucres dans le sang, des nausées et des maux de tête, un rash et des problèmes hépatiques (WebMD 2011). Ces effets secondaires sont négligeables en comparaison des dégâts causés par le virus lui-même. Un autre élément de réponse est que les inhibiteurs de protéases cytotoxiques *in vivo* sont rejetés des études ou pharmaco-modulés. De plus même si certains inhibiteurs de protéases parasitaires sont effectivement actifs contre leurs protéases homologues de mammifères, il est généralement observé que le traitement *in vivo* éradique bien l'infection parasitaire mais sans effets secondaires apparents (Choy, Bryant *et al.* 2013). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette absence d'effet chez l'hôte.

-Les inhibiteurs sont synthétisés pour être spécifiques de la protéase parasitaire. De ce fait, la sélectivité pour la protéase parasitaire est plus forte que celle de la protéase homologue de l'hôte. Par exemple un inhibiteur synthétique dirigé contre *Pf*A-M1 est près de 220 fois plus spécifique pour la protéase parasitaire que pour l'homologue humain ApN (Flipo, Beghyn *et al.* 2007).

-Les cellules de mammifères possèdent plus de protéases en quantité et en diversité que les parasites les rendant moins sensibles aux inhibiteurs mais également plus aptes à compenser le manque d'une protéase donnée (McKerrow, Rosenthal *et al.* 2008).

-Les parasites intracellulaires, de par leur métabolisme, détournent le métabolisme des cellules hôtes pour récupérer les nutriments qui leur sont nécessaires pour leur développement. Ce faisant, ils concentreraient, en même temps que les nutriments, les inhibiteurs de protéases présents dans les cellules hôtes lors des traitements, les rendant beaucoup plus sensibles que les cellules qu'ils infectent (McGrath, Eakin *et al.* 1995).

L’autre point crucial est, comme pour les traitements actuels, le risque d’apparition de parasites résistants. Des travaux réalisés sur *T. cruzi* par deux équipes, ont permis l’obtention de parasites résistants aux inhibiteurs de protéases (McKerrow, Engel *et al.* 1999; Engel, Torres *et al.* 2000; Yong, Schmitz *et al.* 2000). Les parasites ont mis en place deux systèmes de résistance différents. Le premier est une sécrétion massive de la protéase une fois complexée avec l’inhibiteur (Engel, Torres *et al.* 2000) et le deuxième, une diminution de l’internalisation de la drogue et une diminution de l’expression de la protéase cible (Yong, Schmitz *et al.* 2000). Cependant l’obtention de ces parasites résistants fût assez difficile, illustrant selon les auteurs, le coût évolutif élevé de l’acquisition de la résistance (fitness) (McKerrow, Engel *et al.* 1999).

Objectifs de la thèse

La lutte contre la coccidiose aviaire fait actuellement face à deux problèmes : l'apparition croissante de résistance aux drogues anticoccidiennes, et le coût trop élevé des vaccins, produits à partir de souches atténuées (Peek and Landman 2011; Tewari and Maharana 2011). Les moyens prophylactiques sont utilisés dans tous les élevages de volailles dès l'éclosion des œufs. L'apparition de populations parasitaires résistantes aux drogues est donc inévitable, du fait de leur utilisation massive au cours du temps. Les modes d'action et les cibles parasitaires des anticoccidiens étant mal connus, il est difficile de mettre en place une stratégie de contournement de la résistance. Dans ce contexte, la création d'une nouvelle génération d'anticoccidiens correspondant à de nouvelles drogues dont la cible serait connue peut être envisagée. Cette génération de drogue possèderait l'avantage de pouvoir être pharmaco-modulée et ainsi permettre de contourner la résistance lorsque celle-ci apparait.

Notre modèle d'étude est *Eimeria tenella*, l'une des espèces les plus virulentes responsables de la coccidiose aviaire (Kipper, Andretta *et al.* 2013). *E. tenella* est également la première espèce d'*Eimeria* de poulet dont le génome a été séquencé et annoté (Reid, Blake *et al.* 2010). Deux modèles cellulaires sont couramment utilisés pour étudier le cycle biologique du parasite, les cellules MDBK et les cultures primaires PCKC. Les cellules MDBK permettent le développement du stade sporozoïte au stade mérozoïte. Les PCKC quant à elles permettent au parasite de réaliser son cycle dans sa totalité. Leur utilisation est favorisée notamment pour l'étude des stades sexués qui ne peuvent être obtenus avec le modèle MDBK. Peu de données sont disponibles sur la biologie d'*E. tenella*. La connaissance du parasite et des mécanismes moléculaires impliqués dans les étapes cruciales du cycle biologique, permettront de sélectionner les meilleures cibles thérapeutiques.

Chez de nombreux parasites, il est démontré que les protéases sont impliquées dans des processus parasitaires importants comme l'invasion, le métabolisme et le développement (Klemba and Goldberg 2002). De plus, il a été montré que l'altération de leur activité par des inhibiteurs entraîne une abrogation du cycle parasitaire (Eksi, Czesny *et al.* 2007; Larson, Parussini *et al.* 2009; Rieux, Gras *et al.* 2012). De ce fait, les protéases parasitaires représentent des cibles thérapeutiques de choix (McKerrow, Engel *et al.* 1999; Trenholme, Brown *et al.* 2010). A l'heure actuelle, la majorité des recherches sur les inhibiteurs de protéases comme traitement des maladies parasitaires sont réalisées sur les protéases à cystéine (Atkinson, Babbitt *et al.* 2009). Cependant, les autres familles de protéases parasitaires ont également été décrites comme cibles thérapeutiques et notamment les métallo-protéases (Flipo, Beghyn *et al.* 2007; Trenholme, Brown *et al.* 2010). Il faut également noter

qu'une observation réalisée en 2005 a montré que la majorité des inhibiteurs commercialisés en tant que traitements des maladies humaines vise les métallo-protéases (37,5 %), les protéases à sérine (25 %) et les protéases à acide aspartique (23 %) (Abbenante and Fairlie 2005). Parmi les métallo-protéases, la famille des aminopeptidases fait l'objet de nombreuses études chez *Plasmodium* : elle a été décrite comme étant impliquée dans de nombreux processus clefs comme le métabolisme et le développement (Florent, Derhy *et al.* 1998; Allary, Schrevel *et al.* 2002; Ragheb, Bompiani *et al.* 2009; Harbut, Velmourougane *et al.* 2011). Des inhibiteurs dirigés contre les aminopeptidases de *Plasmodium* sont efficaces en traitement *in vivo* de la malaria murine (Chen, Xie *et al.* 2009). Ces protéases sont des cibles thérapeutiques potentielles contre *Plasmodium* (Flipo, Beghyn *et al.* 2007; Trenholme, Brown *et al.* 2010). Cette piste est d'autant plus intéressante que des aminopeptidases homologues à celles de *Plasmodium*, une alanyl (*Pf*A-M1) (Florent, Derhy *et al.* 1998; Allary, Schrevel *et al.* 2002) et une leucyl-aminopeptidase (*Pf*A-M17) (Stack, Lowther *et al.* 2007), sont présentes dans le génome d'*E. tenella* (Katrib, Ikin *et al.* 2012) et des activités enzymatiques de type aminopeptidase ont été détectées dans des lysats parasitaires (Fetterer, Miska *et al.* 2005).

Mon travail de thèse vise à répondre à deux objectifs complémentaires :

1: Caractériser des aminopeptidases d'*E. tenella* dans le but de mieux comprendre la biologie du parasite et ainsi identifier de potentielles cibles thérapeutiques.
2: Evaluer l'effet d'une nouvelle classe de molécules sur les aminopeptidases d'*E. tenella* et leur l'impact sur le développement parasitaire.

La démarche scientifique suivie au cours de ces travaux se divise en 3 étapes que nous allons développer :
-Identification et caractérisation d'activité aminopeptidase au cours du cycle d'*E. tenella* et impact de leur inhibition sur les stades précoces du cycle.

-Recherche d'une nouvelle classe de composés inhibiteurs d'aminopeptidases et validation *in vitro*.

-Pharmaco-modulation pour améliorer les caractéristiques physico-chimiques des composés et leurs affinités pour les aminopeptidases d'*E. tenella.*

Identification et caractérisation de l'activité aminopeptidase au cours du cycle d'*E. tenella* et évaluation de l'effet d'inhibiteur sur les stades précoces du cycle parasitaire

Avant de débuter les travaux, il était nécessaire de vérifier la présence d'aminopeptidases actives au cours du cycle biologique d'*E. tenella* et de déterminer l'effet de leur inhibition sur le développement parasitaire. Pour évaluer la présence d'aminopeptidases actives dans différentes parties du cycle biologique d'*E. tenella,* des tests d'inhibition *in vitro* sur des cellules MDBK infectées par *E. tenella* ont été réalisés. Les effets de la bestatine, un inhibiteur d'aminopeptidases, ont été évalués sur les premières étapes du cycle intracellulaire. La bestatine a été utilisée comme composé chef de file chez *Plasmodium* et a servi à montrer l'implication d'aminopeptidases dans le développement intracellulaire et le métabolisme du parasite (Nankya-Kitaka, Curley *et al.* 1998; Flipo, Florent *et al.* 2003; Flipo, Beghyn *et al.* 2007; Velmourougane, Harbut *et al.* 2011).

Les effets de la bestatine sur les étapes précoces de la phase intracellulaire d'*E. tenella* ont été évalués. Les expérimentations ont révélé que la bestatine n'influençait pas l'invasion des cellules MDBK par les sporozoïtes. En revanche, la bestatine induit une inhibition significative et dose dépendante du développement d'*E. tenella*. Ces résultats révèlent la présence d'aminopeptidases actives impliquées dans le développement d'*E. tenella.* Nous nous sommes ensuite intéressés à la présence des aminopeptidases dans la phase extracellulaire et plus particulièrement pendant la sporulation d'*E. tenella*. Nous avons suivi l'activité des aminopeptidases au cours du temps en utilisant la spectrofluorimétrie. Nous avons choisi comme substrat fluorescent le H-Ala-AMC, qui est utilisé pour étudier les métallo-protéases de type aminopeptidase (Allary, Schrevel *et al.* 2002; Drag, Bogyo *et al.* 2010). Une activité de type aminopeptidase est détectée tout au long de la sporulation et confirmée par sa sensibilité aux inhibiteurs classiquement utilisés contre les aminopeptidases (Nankya-Kitaka, Curley *et al.* 1998).

Pour identifier les protéases responsables de l'activité, un enrichissement de la fraction active contre le substrat H-Ala-AMC a été effectué en collaboration avec Florence Gilbert (INRA, UMR1282, Infectiologie et Santé Publique, F-37380 Nouzilly, France). La fraction contenant les aminopeptidases actives a été enrichie par des étapes de séparation en fonction

du point isoélectrique, de la masse moléculaire et de la spécificité de l'activité vis-à-vis du H-Ala-AMC en zymographie. L'activité des aminopeptidases a été suivie au cours de l'enrichissement par spectrofluorimétrie. Les fractions enrichies ont été analysées par spectrométrie de masse (MS). L'analyse a été réalisée avec le logiciel Mascot sur les groupes *Toxoplasma* et *Alveolata*, aucune banque de MS n'étant disponible pour *Eimeria*. Ces analyses ont permis d'identifier des homologues d'aminopeptidase N d'*Eimeria* : *Et*-ApN1 et *Et*-ApN2 (Katrib, Ikin *et al.* 2012). Lors de cette étude, nous avons également mis en évidence une troisième aminopeptidase N, non annotée dans le génome, que nous avons nommée *Et*-ApN3. La comparaison des séquences des trois aminopeptidases N, avec les résultats de MS, a révélé que seules *Et*-ApN1 et *Et*-ApN3 étaient présentes et actives au cours de la sporulation.

Dans l'objectif de caractériser *Et*-ApN1 et *Et*-ApN3, une analyse phylogénétique a tout d'abord été réalisée à partir des séquences disponibles des différentes aminopeptidases N parasitaires. Cette étude a révélé une forte homologie entre les sites actifs des 2 aminopeptidases d'*E. tenella* et de leur homologue chez *Plasmodium falciparum Pf*A-M1 (Florent, Derhy *et al.* 1998; Allary, Schrevel *et al.* 2002; Ragheb, Dalal *et al.* 2011; Poreba, McGowan *et al.* 2012). Cette étude phylogénétique a été complétée par la modélisation de la structure d'*Et*-ApN1 en collaboration avec Sheena McGowan (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Monash University, Clayton, Victoria, Australia) (McGowan, Porter *et al.* 2009; Velmourougane, Harbut *et al.* 2011; Poreba, McGowan *et al.* 2012). La modélisation, réalisée à partir de sa séquence complète d'*Et*-ApN1, a révélé une homologie de structure avec *Pf*A-M1 (même nombre de domaines et poche catalytique similaire). La modélisation de la molécule constitue également une source d'information importante pour la pharmaco-modulation des inhibiteurs d'aminopeptidases N afin d'optimiser leur spécificité vis-à-vis des aminopeptidases N d'*E. tenella* par rapport à celles de l'hôte.

Afin de comparer les propriétés enzymatiques, biochimiques et la localisation des deux aminopeptidases d'*E. tenella* (*Et*-ApN1 et *Et*-ApN3) à leur homologue chez *Plasmodium* (*Pf*A-M1), nous avons réalisé l'expression des protéines recombinantes d'*Et*-ApN1$_r$ et d'*Et*-ApN3$_r$ en modèle bactérien (Ragheb, Dalal *et al.* 2011). Seule *Et*-ApN1$_r$ a pu être obtenue sous forme soluble et active, elle a été comparée à *Pf*A-M1$_r$. *Et*-ApN3$_r$ est partielle, insoluble et inactive. La spécificité de substrat d'*Et*-ApN1$_r$ a été déterminée en collaboration avec Anna Byzia et Marcin Drag (Division of Bioorganic Chemistry, Faculty of Chemistry, Wroclaw University of Technology, Wroclaw, Poland). Ces manipulations ont été réalisées sur une

bibliothèque de substrats naturels et non naturels (Drag, Bogyo *et al.* 2010; Poreba, McGowan *et al.* 2012). Pour compléter cette étude biochimique, la sensibilité aux inhibiteurs et la dépendance aux ions d'*Et*-ApN1$_r$ ont également été déterminées. Des études complémentaires (PCR-semi quantitatives, western blot et immuno-localisation) ont permis de déterminer les stades parasitaires dans lesquels *Et*-ApN1 et *Et*-ApN3 sont transcrites et exprimées. L'ensemble des résultats a permis de mettre en évidence plusieurs similitudes entre *Et*-ApN1 et *Pf*A-M1 au niveau biochimique, mais également au niveau de la maturation des protéines et de leur localisation (notamment une localisation nucléaire commune). Ces résultats suggèrent que les deux protéases sont impliquées dans des processus similaires, comme le développement. Par extension, nous avons émis l'hypothèse que, comme *Pf*A-M1 (Flipo, Beghyn *et al.* 2007), *Et*-ApN1 représentait une cible thérapeutique potentielle.

Recherche d'une nouvelle classe de composés inhibiteurs d'aminopeptidases et validation *in vitro*

Dans le but de soutenir l'hypothèse selon laquelle *Et*-ApN1 représente une cible thérapeutique potentielle, nous avons cherché de nouvelles molécules inhibitrices de l'activité de cette aminopeptidase N. Chez *Plasmodium* une partie des recherches réalisées ont pris le parti de faire des dérivés de la bestatine spécifique de *Pf*A-M1 (Velmourougane, Harbut *et al.* 2011). Pour *Et*-ApN1, les résultats obtenus ont révélé que cette protéase est beaucoup moins sensible à la bestatine que *Pf*A-M1 *in vitro*. Nous avons donc choisi de cribler une banque de molécules de structures inédites. Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'ensemble de l'équipe de Recherche et Innovation en Chimie Médicinale (RICM) de Cécile Enguehard-Gueiffier et Mohamed Abarbri (Université François-Rabelais, Tours, France).

Le criblage de la banque a été réalisé par l'évaluation de l'effet des composés contre l'activité aminopeptidase N d'un lysat d'oocystes non sporulés par spectrofluorimètrie. Nous avons fixé notre seuil de sélection des molécules à une inhibition de 90 % de l'activité aminopeptidase. Dans un premier temps, nous avons groupé les molécules par 5 afin de procéder à un criblage préliminaire plus rapide. Les molécules des groupes répondant à ce critère ont, dans un deuxième temps, été testées individuellement. Les molécules capables d'inhiber 90 % ou plus de l'activité aminopeptidase ont été sélectionnées. Sur 50 molécules initiales, 5 molécules répondant à ce critère ont pu être retenues. L'objectif étant d'identifier un inhibiteur spécifique de l'activité aminopeptidase, l'effet des inhibiteurs sélectionnés a été évalué vis-à-vis de l'activité de deux autres protéases de référence de la famille des protéases

à cystéine (papaïne) et des protéases à sérine (trypsine). Les résultats ont été comparés à ceux d'*Et*-ApN1. Les molécules possédant l'effet inhibiteur le plus fort contre *Et*-ApN1 ont été sélectionnées. Sur les 5 molécules précédemment sélectionnées, seules 3 étaient des inhibiteurs plus spécifiques de l'activité aminopeptidase. La dernière phase de sélection a porté sur la cytotoxicité des composés. La toxicité cellulaire des trois composés a ainsi été évaluée sur des cellules MDBK. La cytotoxicité aigue des trois composés a été observée par une observation microscopique de cellules incubées avec les molécules pendant 24 h. Seul un composé, le C36, ne présentait pas de toxicité aigüe sur le tapis cellulaire. L'absence totale de cytotoxicité du C36, a ensuite été confirmée par un test au dimethyl thiazoldiphenyl-tetrazolum bromide (MTT). Finalement, l'ensemble des différentes phases de sélection nous a permis d'identifier un composé actif contre l'activité aminopeptidase N d'*E. tenella* et non cytotoxique.

Avant de réaliser les tests *in vitro*, nous avons vérifié et confirmé l'interaction directe entre le C36 et *Et*-ApN1$_r$. Pour évaluer le potentiel *in vitro* du C36, des cellules MDBK infectées par *E. tenella* ont été incubées avec différentes concentrations de C36. Comme ce qui a été observé avec la bestatine, le C36 n'influence pas l'invasion mais inhibe fortement et de façon dose dépendante le développement d'*E. tenella* et ce, à une concentration 20 fois inférieure à celle de la bestatine. Afin de déterminer à quel moment du développement intervenait l'inhibition par le C36, nous avons recherché la fenêtre d'action du C36 en ajoutant le composé à différents temps. Ceci nous a permis d'observer que le C36 est efficace s'il est ajouté entre 0 h et 24 h après le début de l'invasion. Ce laps de temps correspond à la translocation d'*Et*-ApN1 dans le noyau, renforçant l'hypothèse de l'inhibition du développement par la simple inhibition d'*Et*-ApN1.

Nous avons ensuite voulu savoir si l'effet inhibiteur du C36 observé sur le développement d'*E. tenella,* était conservé chez d'autres parasites, et plus particulièrement d'autres coccidies. Nous nous sommes donc intéressés à *T. gondii* dont le génome code également pour trois aminopeptidases N putatives. La présence d'une activité de type aminopeptidase N et son inhibition par le C36 ont été vérifiés avec un lysat de tachyzoïtes. Après avoir vérifié que le C36 n'avait pas d'effet sur l'invasion des cellules par *T. gondii,* nous avons évalué son effet sur le développement à l'aide de tests de plages de lyse. L'ajout de C36 inhibe significativement ($p < 0,001$) le développement de *T. gondii,* de manière dose dépendante. La corrélation entre l'inhibition du développement d'*E. tenella* et celle de *T. gondii* étant très intéressante, nous avons souhaité savoir si ce composé conservait son effet

inhibiteur sur un autre parasite du phylum des apicomplexes. Nous avons donc choisi comme modèle *P. falciparum*. Pour ce faire, nous avons travaillé en collaboration avec l'équipe « Dynamique des Interactions Membranaires Normales et Pathologiques » d'Henri Vial (Calas, Cordina *et al.* 1997; Peyrottes, Caldarelli *et al.* 2012). Le choix du modèle *P. falciparum* était d'autant plus pertinent. En effet ce sont les études comparatives entre *Pf*A-M1 et *Et*-ApN1, qui nous ont permis d'émettre l'hypothèse que comme *Pf*A-M1, *Et*-ApN1 était une cible thérapeutique potentielle. Il était donc intéressant d'évaluer si notre inhibiteur sélectionné pour sa capacité à inhiber l'activité d'*Et*-ApN1 conservait ses effets chez *P. falciparum*. Les résultats ont montré que le C36 inhibait également le développement de *P. falciparum*.

Pharmaco-modulation pour améliorer les caractéristiques physico-chimiques des composés et leur affinité pour les aminopeptidases d'*E. tenella*

Nos travaux ont permis d'identifier le C36 comme nouvel inhibiteur d'aminopeptidase N et capable d'inhiber le développement intracellulaire de trois apicomplexes. Cependant, le C36 forme des cristaux à forte concentration, ce qui est incompatible avec des tests *in vivo*. Il s'est donc révélé nécessaire de réaliser des modifications structurales, appelées pharmaco-modulations, pour améliorer la solubilité, la biodisponibilité du composé et pour diminuer son effet sur l'organisme de l'hôte. La structure du C36 constitue la base sur laquelle plusieurs modifications ont été apportées par l'équipe RICM (Inack Ngi, Guilloteau *et al.* 2011). Ces travaux nous ont permis de déterminer que les petits groupements d'alcyne dépourvus de triple liaison supplémentaire et d'ester (groupement fortement hydrophobe) améliorent nettement la solubilité du composé, tout en conservant son effet inhibiteur. L'ensemble de la démarche scientifique suivie au cours de ma thèse est schématisée ci-dessous (Figure 25).

L'ensemble des travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis la caractérisation de deux aminopeptidases d'*E. tenella*, *Et*-ApN1 et *Et*-ApN3, et la découverte d'un nouvel d'inhibiteur du développement parasitaire *in vitro* le C36. Ces travaux sont divisés en trois chapitres.

Les deux premiers chapitres sont dédiés à *Et*-ApN1 et *Et*-ApN3. Pour une lecture plus facile, nous avons choisi de présenter les travaux concernant ces deux aminopeptidases dans deux chapitres indépendants. Ces deux chapitres correspondent à la première étape d'identification et de caractérisation d'activité aminopeptidase au cours du cycle d'*E. tenella*.

Les deux dernières étapes de recherche d'une nouvelle classe de composés inhibiteurs d'aminopeptidases ainsi que celle de pharmaco-modulation de ces composés sont regroupés sous un dernier chapitre dédié à la caractérisation des effets du composé C36.

L'ensemble des travaux de recherche seront ensuite discutés dans leur ensemble sous la forme d'une discussion générale et d'une conclusion.

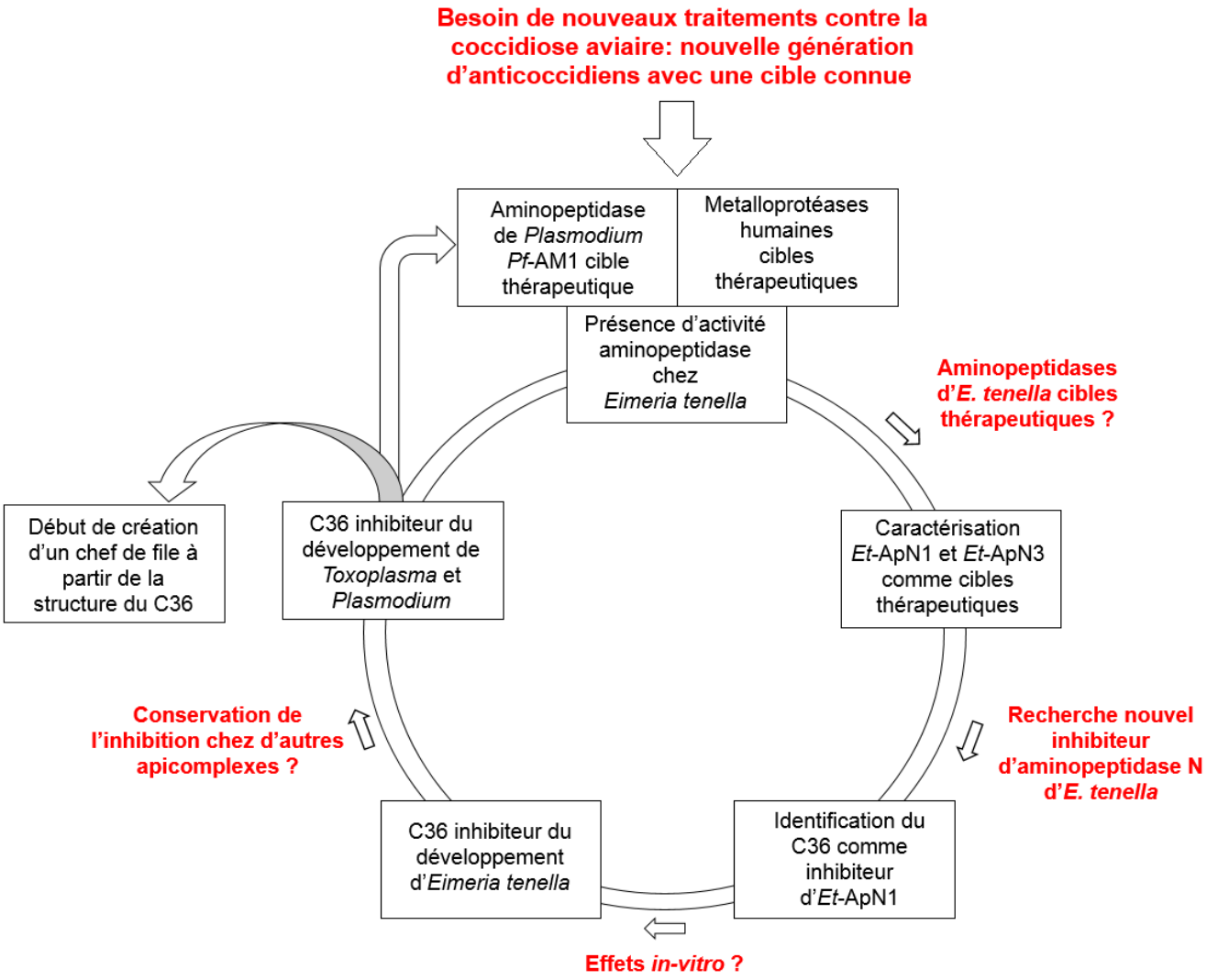


Figure 25 : Résumé de la démarche scientifique suivie au cours de ma thèse

Les différentes étapes, questions cruciales et résultats qui ont articulé l'avancement de mon travail de recherche sont schématisés ci-dessus.

Résultats

Chapitre 1 : Caractérisation de la métallo-protéase *Et*-ApN1

L'ensemble de ces travaux a été soumis pour publication

L'aminopeptidase N1 (*Et*-ApN1), une M1 métallo-protéase du parasite apicomplexe *Eimeria tenella*, participe au développement parasitaire

Simon Gras[1,2], Anna Byzia[3], Florence B. Gilbert[1,2], Sheena McGowan[4], Marcin Drag[3], Anne Silvestre[1,2], Alisson Niepceron[1,2], Fabien Lecaille[5], Gilles Lalmanach[5], Fabien Brossier[1,2]

[1] INRA, UMR1282, Infectiologie et Santé Publique, F-37380 Nouzilly, France.

[2] Université François Rabelais de Tours, UMR1282, Infectiologie et Santé Publique, F-37000, France

[3] Division of Bioorganic Chemistry, Faculty of Chemistry, Wroclaw University of Technology, Wroclaw, Poland

[4] Department of Biochemistry and Molecular Biology, Monash University, Clayton, Victoria, Australia

[5] Université François Rabelais de Tours, INSERM, UMR 1100, Equipe «Mécanismes protéolytiques dans l'inflammation» - Centre d'Etude des Pathologies Respiratoires (CEPR), F-37000 Tours, France.

Mots clefs: Métallo-protéase, Aminopeptidase, Inhibiteur de protéase, Modélisation moléculaire, Protozoaire, Apicomplexe, *Eimeria tenella*.

Contexte scientifique: Le génome *Eimeria tenella* code pour au moins 45 protéases. Actuellement, seulement une minorité a été caractérisée fonctionnellement.

Résultats: Nous avons fonctionnellement caractérisé *Et*-ApN1, une métallo-protéase de la famille M1. Cette protéase pourrait jouer un rôle critique dans le développement parasitaire et possède de très fortes homologies avec l'aminopeptidase de *Plasmodium*, *Pf*A-M1.

Conclusion: *Et*-ApN1 joue un rôle clef dans le développement intracellulaire d'*E. tenella.*

Significativité: *Et*-ApN1 représente une nouvelle cible thérapeutique potentielle pour le contrôle de la coccidiose et pourrait servir à la production d'une nouvelle génération de drogue anticoccidienne avec une cible connue.

a. Introduction

Les coccidioses aviaires sont parmi les maladies aviaires les plus importantes dues aux pertes économiques majeures qu'elles engendrent (Williams 1999; Sharman, Smith *et al.* 2010). Elles sont causées par l'infection intestinale des poulets avec des parasites du genre *Eimeria*. Le cycle biologique de ces parasites comprend deux phases : une phase intestinale et une phase exogène qui se déroule dans le milieu extérieur. La phase intestinale comprend : l'invasion des cellules épithéliales du poulet par les sporozoïtes, le développement des schizontes qui contiennent des mérozoïtes, la différenciation en gamètes mâles et femelles, la fécondation et la formation des oocystes non sporulés. La phase exogène implique la libération des oocystes non sporulés dans l'environnement et leur maturation en oocystes sporulés infectieux (Norton and Chard 1983). Ces maladies infectieuses sont actuellement contrôlées par l'addition préventives d'anticoccidiens dans la nourriture des poulets ou par l'administration de vaccins qui sont des souches atténuées (Tewari and Maharana 2011). Cependant, l'augmentation des populations parasitaires résistantes aux drogues et le coût des vaccins soulignent la nécessité de trouver des cibles thérapeutiques alternatives et donc de développer de nouvelles drogues (Peek 2010).

Le genre *Eimeria* appartient au phylum des apicomplexes, un groupe d'importance économique et médical pour l'homme dans lequel sont notamment retrouvés *Plasmodium spp.* (agent de la malaria) et *Toxoplasma gondii* (agent de la toxoplasmose). Parmi les 7 espèces qui infectent les poulets, *Eimeria tenella* est l'une des plus virulentes (Kipper, Andretta *et al.* 2013) et la seule dont le génome a été séquencé et partiellement annoté (Reid, Blake *et al.* 2010). Deux modèles cellulaires sont actuellement disponibles pour étudier le développement intracellulaire du parasite, les cellules MDBK et PCKC (Hofmann and Raether 1990; Tierney and Mulcahy 2003).

Comme chez d'autres apicomplexes, il a été émis l'hypothèse selon laquelle les protéases seraient impliquées dans le cycle biologique d'*E. tenella*. Des résultats précédents supportent cette hypothèse (Rieux, Gras *et al.* 2012). Parmi les protéases parasitaires, les métallo-protéases ont été impliquées dans la pathogenèse et interviennent dans des mécanismes d'échappement au système immunitaire, de développement et de métabolisme (Harbut, Velmourougane *et al.* 2011; Moon, Kang *et al.* 2011; Matheoud, Moradin *et al.* 2013). L'analyse du génome d'*E. tenella* a révélé la présence d'au moins 45 gènes codant pour des protéases dont 31 % correspondent à des métallo-protéases transcrites dans différents stades du cycle parasitaire (Katrib, Ikin *et al.* 2012).

La présence d'une métallo-protéase active de la famille M1 (Aminopeptidase M1 ; Alanyl-aminopeptidase, Aminopeptidase N) a précédemment été décrite dans un lysat d'oocystes d'*E. tenella* au cours de la sporulation (Fetterer, Miska *et al.* 2005). Des analyses récentes du génome ont identifié deux aminopeptidase-N like putatives appartenant à la famille M1 (*Et*-ApN1 et *Et*-ApN2) (Katrib, Ikin *et al.* 2012). Aucune autre information n'est disponible sur les propriétés ou fonctions des aminopeptidases N d'*E. tenella*. En revanche, l'aminopeptidase N du parasite *Plasmodium falciparum*, *Pf*A-M1, a été caractérisée (Florent, Derhy *et al.* 1998). Elle a été localisée dans différents compartiments cellulaires en fonction du stade parasitaire comme la vacuole parasitophore, la « food vacuole » (Azimzadeh, Sow *et al.* 2010; Ragheb, Dalal *et al.* 2011), le cytoplasme (Allary, Schrevel *et al.* 2002; McGowan, Porter *et al.* 2009) et le noyau (Dalal and Klemba 2007; Azimzadeh, Sow *et al.* 2010; Ragheb, Dalal *et al.* 2011). Des études utilisant des dérivés de l'inhibiteur d'aminopeptidases, la bestatine, ont révélé que *Pf*A-M1 est impliquée dans le métabolisme et le développement du parasite (Azimzadeh, Sow *et al.* 2010; Harbut, Velmourougane *et al.* 2011; Ragheb, Dalal *et al.* 2011).

Nous avons évalué la présence d'aminopeptidases actives dans les étapes de développement et de sporulation d'*E. tenella* en utilisant la bestatine et un substrat fluorescent spécifique des aminopeptidases. Nous nous sommes ensuite spécifiquement intéressés à *Et*-ApN1 et ses propriétés moléculaires et biochimiques. Nous avons défini les caractéristiques enzymatiques d'*Et*-ApN1 et les avons comparées avec celles de *Pf*A-M1. De plus, nous avons étudié le profil d'expression d'*Et*-ApN1 pendant la sporulation d'*E. tenella* et sa localisation subcellulaire pendant le développement parasitaire.

b. Matériels et méthodes

Ethique

Les protocoles expérimentaux sont réalisés en accord avec la loi française (Décret 2001-464 29/05/01) concernant l'utilisation des animaux en laboratoire. Les méthodes de soin et d'euthanasie des animaux sont en accord avec le guide d'éthique national et approuvées par le comité d'éthique de la Région Centre (CL2007-36).

Obtention des parasites *Eimeria tenella* et culture cellulaire

Des groupes de poulets PA12, âgés de 4 à 6 semaines, sont infectés oralement avec 10^4 et 10^5 oocystes sporulés avec les souches d'*E. tenella* Wis/Wis YFP+ et Wis 96, respectivement (Jeffers 1975). Les oocystes non sporulés sont récoltés à partir des caeca infectés, 7 et 5 jours après inoculation des animaux avec les souches Wis/Wis YFP+ et Wis 96, respectivement. Les oocystes non sporulés sont ensuite purifiés avec une première étape d'incubation dans de l'hypochlorite de sodium pour éliminer les bactéries puis une étape de flottation dans du sulfate de magnésium comme décrit précédemment (Shirley 1995). Pour leur permettre de sporuler, les oocystes sont suspendus dans de l'eau contenant 2 % de dichromate de potassium et incubés pendant 72 h à 26°C. Les sporozoïtes sont obtenus à partir d'oocystes fraichement sporulés. Les parois des oocystes sont broyées mécaniquement à l'aide de billes de verre de 0,5 mm et les sporocystes récupérés sont incubés dans du milieu d'excystation (trypsine 0,25 % (Sigma, USA), sels biliaires 0,5 % (VWR, USA) dans du PBS pH 7,4) à 41°C pendant une heure. Les sporozoïtes sont ensuite purifiés par une filtration en deux étapes, la première sur du coton et la seconde sur un filtre de polycarbonate de 5 µM (Whatman, USA). Les mérozoïtes de 2ème génération (M2) sont obtenus comme décrit précédemment (Lal, Bromley *et al.* 2009). Les cellules MDBK sont maintenues en continu en culture dans du milieu HAM's F12 contenant 10 % de SVF, 2 mM de glutamine, 10 U/mL pénicilline et 10 µg/mL streptomycine comme décrit précédemment (Rieux, Gras *et al.* 2012).

Effets de la bestatine sur des MDBK infectées par *E. tenella*

Des sporozoïtes (2×10^5) d'*E. tenella* exprimant constitutivement la « Yellow Fluorescent protein » (Wis YFP+) sont incubés avec 2×10^5 cellules MDBK (Madin-Darby bovine kidney) dans des plaques 24 puits. Différentes concentrations de bestatine (50 – 500 µM) sont ajoutées. Les cellules sont mises en culture pendant 4 h et 96 h à 41°C, et 5 %

CO_2 comme décrit précédemment (Brown, Billington *et al.* 2000). L'absence de cytotoxicité de la bestatine a été vérifiée par un test au dimethyl thiazoldiphenyl-tetrazolum bromide (MTT) (Mosmann 1983). Pour les tests d'invasion, les cellules infectées sont lavées et fixées au paraformaldéhyde (Marquardt, Pafume *et al.*) 2,7 % à 4 h post infection (p.i.). Les lamelles sont ensuite mises en contact avec du Vectashield contenant 1,5 µg/mL de DAPI (CliniSciences, France). Les lames sont observées au microscope à fluorescence (Zeiss Axiovert 200 microscope, Carl Zeiss, Germany). Chaque expérimentation a été réalisée en duplicata pour chaque condition et reproduite 3 fois de manière indépendante. Pour les tests de développement, à 96 h, les mérozoïtes présents dans le surnageant de culture de chaque condition ont été comptés. Les expériences ont été réalisées en triplicata. Les taux de développement et d'invasion sont évalués en pourcentage par rapport à des cellules non traitées et sont exprimés sous la forme de la moyenne et des écarts-types des trois expérimentations.

Mesure de l'activité enzymatique

Les lysats d'oocystes sont obtenus par destruction mécanique des oocystes avec des billes de verre de 0,5 mm dans du tampon PBS 10 mM pH 7,4. Les lysats sont ensuite soumis à 2 cycles de sonication de 30 s comprenant 5 s d'impulsion d'amplitude 40 (Bioblock scientific, Vibracell 75455, Fisher, USA). Après centrifugation (15 000 g, 30 min, 4°C), les surnageants sont prélevés et la concentration protéique est déterminée par colorimétrie avec de l'acide bicinchonique ou BCA (Smith, Krohn *et al.* 1985). Les lysats sont dilués à une concentration finale de 1 mg/mL et stockés à -80°C. Pour mesurer l'activité enzymatique, 40 µg de lysat d'oocystes sont incubés dans du tampon de réaction (10 mM phosphate buffer pH 7,4 ; 70 mM NaCl) avec un substrat fluorescent, le H-Ala-AMC ((Ala-(7-Amido-4-methylcoumarin)) (Genecust, Luxembourg), à une concentration finale de 20 µM. L'activité enzymatique est enregistrée (λ excitation = 350 nm et λ émission = 450 nm) pendant 2 minutes à l'aide d'un spectrofluorimètre (Photon Technology International, USA). Chaque test est réalisé en triplicata. L'activité aminopeptidase correspond à la moyenne des réplicats ± l'écart-type. Pour les tests d'inhibition de l'activité enzymatique, le lysat est pré-incubé pendant 10 min avec l'inhibiteur (bestatine, la 1,10-ortho-phénantroline ou l'amastatine de 1 à 1000 µM) puis le substrat, H-Ala-AMC, est ajouté. L'activité résiduelle est enregistrée comme décrit précédemment.

Zymographie native

Les échantillons sont repris dans du tampon de charge natif puis les protéines sont séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide avec une réticulation de 8 % contenant 200 µM d'H-Ala-AMC (6 h, 100 V). Pour permettre la réaction enzymatique, le gel est incubé dans du tampon de réaction à 37°C pendant 10 min. L'activité enzymatique est révélée sous UV avec un appareil Biot-Capt Xpress (Vilber Lourmat, France).

Fractionnement des protéines d'oocystes et identification des protéases par spectrométrie de masse

Un lysat d'oocystes (5 x 10^8) est obtenu par broyage avec des billes de verre puis sonication comme décrit précédemment. Après centrifugation pendant 30 min à 15 000 g à 4°C, le surnageant a été prélevé (volume final 10 mL) et soumis à une isoélectrofocalisation en veine liquide (Cellule Rotofor de 60 mL, Bio-Rad Laboratories, USA). Le volume de l'échantillon a été complété à 50 mL avec de l'eau et des ampholytes (BioLyte, gamme de pH = 3 – 10, Bio-Rad, USA) ont été ajoutés à 2,5 % (w/v). L'échantillon a été chargé dans le Rotofor et la focalisation isoélectrique a été réalisée à une puissance constante de 12 W pendant 5 h à 3°C. Les vingts fractions ont été immédiatement collectées, leur pH a été déterminé et l'activité enzymatique vis-à-vis du H-Ala-AMC analysée (20 µM final, λ_{ex} = 350 nm, λ_{em} = 450 nm). Les fractions positives ont été regroupées e concentrées à un volume final de 1 mL et ce concentrat a été injecté dans une colonne de chromatographie d'exclusion par la taille (TSK G4000PW 600 x 7.5 mm HPLC column, Tosohaas, Cluzeau Info Labo, France), équilibrée avec un tampon de 150 mM phosphate de sodium, pH 7,4 et un Äktapurifier 10 (GE Healthcare, Orsay, France). La chromatographie a été réalisée à un débit de 0,5 mL/min et suivie par détection UV à 214 et 280 nm. Quarante fractions de 0,5 mL ont été recueillies et les fractions actives ont été regroupées et concentrées dans un volume final de 1 mL. Cet échantillon a été déposé sur un gel de polyacrylamide non dénaturant avec une réticulation de 8 % contenant 200 µM d'H-Ala-AMC pour une étude en zymographie native. Après migration (100 V, 6 h) à température ambiante dans des conditions non dénaturantes, le gel a été incubé dans du tampon de réaction comme décrit ci-dessus. La bande d'intérêt a été excisée et envoyée à la plateforme de spectrométrie de masse de l'Institut Pasteur de Paris pour l'identification des protéases par MS-MS.

Extraction d'ARN et RT-PCR

Des oocystes (5×10^7) sont prélevés à différents temps après le début de la sporulation (0, 12 et 72 h) et broyés comme décrit précédemment. Les ARN de chaque lysat ainsi que de 2 autres stades parasitaires, des mérozoïtes 2ème génération (10^7) et des gamétocytes (10^6), sont extraits avec 1 mL de guanidinium thiocyanate-phénol-chloroforme (TRIzol®, Invitrogen, USA) selon le protocole fourni par le fabricant. Les ARN totaux sont suspendus dans l'eau traitée au diéthyl pyrocarbonate (DEPC) à une concentration finale de 1 mg/ml. Des aliquots de 1 µg d'ARN totaux sont utilisés pour une rétro transcription des ARNm en utilisant des amorces Poly dT et une transcriptase réverse de type II (Invitrogen). Dans le but d'étudier le profil de transcription d'*Et*-ApN1 et *Et*-ApN2, des fragments d'ADNc sont amplifiés en utilisant les amorces spécifiques d'*Et*-ApN1 (5'-GTTTTATAGCAATCTTATA-GTCTTC-3' et 5'-CGACCCGCAACGAGGAGCATACGC-3'); d'*Et*-ApN2 (5'-GGCCGCC-ACTTCGCCATTTTC-3' et 5'-GATGAGCTACTTTGGCACC-3'), et de l'actine (5'-ATCT-TCATCGTAGACGGAGCCAG-3' et 5'-GTGTGTCCCACACTGTTCCTATC-3') utilisée comme gène de ménage. Les conditions pour la PCR sont : 95°C 1 min, 55°C 30 s et 72°C 1 min pendant 30 cycles avec de la GoTaq DNA polymérase (Promega, USA). Les produits d'amplifications sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose 1 %, contenant 0,5 µg/mL de bromure d'éthidium.

Séquençage d'*Et*-ApN1

La séquence complète d'*Et*-ApN1 est clonée à partir d'ADNc d'oocystes non sporulés avec les amorces ApN1For (5'- GTTTTATAGCAATCTTATAGTCTTC-3') et ApN1Rev (5'- CA-TTGACTGTCCCGTTCTGTTTGCC-3') déterminées à partir de la séquence prédite d'*Et*-ApN1 (ETH_00013105) en amont du codon « start » et en aval du codon « stop ». *Et*-ApN1 est amplifiée en utilisant la Phusion High Fidelity DNA polymérase (New England Biolabs, USA). Les conditions d'amplification sont 95°C 1 min, 55°C 30 s, 72°C 2 min pendant 30 cycles. Le produit d'amplification est visualisé par migration sur gel d'agarose 1 %. Le fragment d'intérêt est excisé du gel et purifié avec le kit Nucleospin® (Macherey Nagel, Allemagne). Pour permettre la ligation dans le vecteur, une adénine est ajoutée aux extrémités (72°C pendant 20 min, 10 µM dATP et 5 u de GoTaq DNA polymérase (Promega, USA). Puis le fragment est inséré dans un vecteur *pGEM*® (Promega, USA) afin de le séquencer. La séquence a été soumise à GenBank et est accessible au numéro d'accession suivant : KF602061.

Alignement et arbre phylogénétique

L'alignement de la séquence en acides aminés des *Et*-ApN et de plusieurs membres de la famille métallo-protéase M1 d'autres parasites a été réalisé avec le programme Cobalt (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/cobalt.cgi?link_loc=BlastHomeLink) en utilisant les numéros d'accessions suivants : *E. tenella Et*-ApN1 (KF602061), *P. falciparum Pf*A-M1 (Y09081), *E. coli* ApN (NP_415452.1), *S. cerevisiae* Ala/Arg aminopeptidase (NP_011913.1) and *H. sapiens* ApN (NP_001141.2). Le pourcentage d'identité en acides aminés dans la région $HExxHx_{18}E$, entre la séquence *Et*-ApN1 et celle des autres métallo-protéases, a également été calculé grâce au programme Cobalt. L'arbre phylogénétique a été construit en utilisant le programme MEGA 5 (Tamura, Peterson *et al.* 2011), avec un alignement de type Muscle et la méthode de « neighbor joining ». Le calcul de « bootstrap » a été effectué à partir de 10000 ré-échantillonnages. Les numéros d'accession des séquences prédites utilisées sont : *E. tenella Et*-ApN2 (ETH_00015595), *T. gondii Tg*-ApN1 (TGME49_224460), *Tg*-ApN2 (TGME49_224350), *Tg*-ApN3 (TGME49_221310) et *N. canimun Nc*-ApN1 (NCLIV_048230), *Nc*-ApN3 (NCLIV_048240) sur la banque de donnée Toxodb (http://toxodb.org/toxo/). La nouvelle séquence d'*E. tenella Et*-ApN1 (KF602061) a également été utilisée ainsi que les séquences de *C. hominis* (XP_668534.1), *C. parvum* (Xp_627236.1), *P. falciparum* (Y09081), *P. vivax* (XP_001617047), *P. berghei* (XP_680130.1) and *H. sapiens* (NP_01141.2) obtenues dans la banque de données de protéines de NCBI.

Modélisation moléculaire

La protéine *Et*-ApN1 possède une forte homologie de séquence avec d'autres aminopeptidases N parasitaires, en particulier avec des homologues de *Toxoplasma*, *Neospora* et *Babesia* spp (± 50 % d'identité sur la séquence complète). L'identité de séquence avec *Pf*A-M1 de *P. falciparum* est de 37 %. Pour générer un modèle moléculaire d'*Et*-ApN1, un alignement structure-base a été généré par Sheena McGowan en utilisant le logiciel Chimera (Pettersen, Goddard *et al.* 2004) avec la structure de l'aminopeptidase M1 *d'Escherichia coli (pEpN)* comme modèle (l'identité de séquence avec *E. coli* est de 42%). Les programmes Modeller, CNS et Pymol ont été utilisés pour fournir le modèle de la figure 27C (Brunger, Adams *et al.* 1998; Eswar, Webb *et al.* 2006).

Expression de la protéine recombinante Et-ApN1$_r$

Un fragment d'ADN de 3,6 kb codant pour la protéine *Et*-ApN1 (acides aminés 242-1093) de 102 kDa a été amplifié à partir d'ADNc d'oocystes non sporulés avec les amorces rApN1ForBgl2 (5'-GGGAGATCTCGAAGAGGACGACCAGGGGAGAAATTC-3') et rApN1RevEcoR1 (5'-GGCTCTGGACTCACCTCATTCGTCGCCATGAGAATTCGGG-3') en utilisant l'ADN polymérase Phusion-High Fidelity (New England Biolabs, USA) comme pour le clonage d'*Et*-ApN1. Le vecteur d'expression pBad-6xHis-*Et*-ApN1 a été obtenu par ligation de l'insert dans le plasmide pBad His B (Invitrogen, USA), grâce aux sites de restriction *Bgl II* et *EcoR I* (New England Biolabs, USA). Des bactéries *E. coli* Top10 (Invitrogen, USA) ont été transformées avec le vecteur d'expression. Ces bactéries sont mises en culture dans du bouillon LB (Sigma, USA) à 25°C avec 0,02 % de L-arabinose (Sigma, USA) pendant une nuit pour permettre l'expression de la protéine recombinante (*Et*-ApN1r). La protéine *Et*-ApN1$_r$ a été purifiée en conditions natives, en suivant les recommandations du kit Protino® Ni-NTA agarose (Macherey-Nagel, Germany). Brièvement, les cultures bactériennes ont été centrifugées (6000 g, 10 min, 4°C). Les culots ont été suspendus en NPI10 et lysés par 5 cycles de sonication de 30 s comprenant 5 s d'impulsion à une amplitude de 40. Après centrifugation (10 000 g, 30 min 4°C), le surnageant est incubé avec 1 mL de bille Ni-NTA pendant 1 h à 4°C sous agitation (20 tours.min^{-1}). Après lavage des billes dans du tampon NPI20, *Et*-ApN1r est éluée dans 2 mL de tampon NPI250 et dialysée pendant une nuit à 4°C dans 1 L de PBS 10 mM pH 7,5, 70mM NaCl, en utilisant une membrane avec un cut-off de 8 kDa (Spectrum Laboratory, USA). La concentration en protéines est déterminée par la méthode BCA (Bio-Rad Laboratories, USA) et l'activité enzymatique est vérifiée par fluorimétrie avec le substrat H-Ala-AMC. Les échantillons sont stockés à -20°C.

Substrats préférentiels d'*Et*-ApN1 et paramètres cinétiques

L'analyse de la préférence en substrat et la détermination des paramètres cinétiques K_m, k_{cat} et K_m/k_{cat} sont réalisées par une méthode dite de « fingerprinting » comme décrit précédemment (Drag, Bogyo *et al.* 2010; Poreba, McGowan *et al.* 2012). Brièvement, la spécificité de substrat d'*Et*-ApN1 est mesurée contre 61 acides aminés naturels et non-naturels. L'activité d'*Et*-ApN1$_r$ est évaluée dans du tampon PBS 10mM, pH 7,4 avec 70 mM NaCl à 37°C. Le signal de fluorescence est enregistré à λ excitation = 355 nm,

λ émission = 460 nm pendant 30 min. Chaque enregistrement est répété en triplicates et la moyenne des enregistrements et l'écart-type ont été calculés.

Réactivation par des ions métalliques et effets des inhibiteurs

La capacité d'ions métalliques (Zn^{2+}, Cu^{2+}, Co^{2+}, Fe^{2+}, Mn^{2+}, Mg^{2+}) à restaurer l'activité d'*Et*-ApN1$_r$ a été évaluée. Avant chaque mesure, la protéine recombinante est inhibée 30 min avec de 1,10-ortho-phénantroline (10 mM) puis dialysée 30 min contre du tampon de réaction. Après vérification de l'inhibition (activité résiduelle de 8 % de l'activité initiale), les cations sont ajoutés indépendamment (1 - 1000 µM) avant l'ajout de H-Ala-AMC (20 µM). Pour les tests d'inhibition de la bestatine, de l'amastatine, de l'E64 et de l'AEBSF (1 - 100 µM) sont pré-incubés avec *Et*-ApN1$_r$ pendant 10 min avant ajout d'H-Ala-AMC (20 µM). L'activité est enregistrée au fluorimètre comme décrit précédemment. Chaque expérimentation a été réalisée en triplicata.

Obtention des anticorps anti-*Et*-ApN1

Des lapins sont immunisés par voie intradermique avec 100 µg d'*Et*-ApN1$_r$ en émulsion dans de l'adjuvant de Freund complet et stimulé 6 fois avec 2 semaines d'intervalle en injectant 200 µg d'*Et*-ApN1$_r$ en émulsion dans de l'adjuvant de Freund incomplet. Le sérum total des lapins (Lα-*Et*-ApN1) est obtenu par centrifugation à 850 g pendant 15 min à température ambiante. La spécificité des anticorps a été évaluée par western blot.

Western blot

Les échantillons (protéine recombinante *Et*-ApN1 et des lysats d'*E. tenella*) sont préparés avec un tampon Laemmli contenant 2 % v/v de β-mercapthoéthanol. Les échantillons sont ensuite dénaturés pendant 5 min à 95°C. Les protéines sont séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide d'une réticulation de 10 %, puis transférées sur une membrane de nitrocellulose (Hybond ECL, GE Healthcare, USA). La membrane est saturée avec du lait écrémé 5% et incubée avec les anticorps primaires Lα-*Et*-ApN1$_r$ (1:500). Des anticorps de chèvre anti-Lapin couplés à la peroxydase sont utilisés comme anticorps secondaires (1:5000, Sigma, USA). L'immunodétection est réalisée en utilisant le kit SuperSignal™ West Pico chemiluminescent susbtrates en suivant les recommandations du fournisseur (Pierce, ThermoFisher Scientific, USA). La membrane est ensuite révélée avec un ChemiSmart5000 (Vilber Lourmat, France).

Immuno-localisation d'*Et*-ApN1

Des cellules MDBK (Madin-Darby bovine kidney, 2 x 10^5) sont infectées avec des sporozoïtes (2 x 10^5) dans des plaques de 24 puits pendant des temps variables (4 à 120 h) à 41°C et 5 % de CO_2. Pour les mérozoïtes de 2ème génération et les gamètes, les sporozoïtes sont incubés avec une culture primaire de cellules de reins de poulets (PCKC) comme décrit précédemment (Hofmann and Raether 1990). Les cellules sont infectées soit avec la souche sauvage *E. tenella* Wis (pour les étapes précoces d'invasion et les mérozoïtes de seconde génération) soit avec la souche précoce *E. tenella* Wis 96, qui ne possède qu'une génération de mérozoïtes et permet une formation plus rapide des gamètes (96 h au lieu de 135 h avec la souche Wis). Les cellules infectées sont lavées et fixées au PAF 2,7 %. Après perméabilisation avec 0,1 % Triton X-100, les parasites intracellulaires sont marqués en utilisant les anticorps Lα-*Et*-ApN1$_r$ (1:500) avec un anticorps Sα-Enolase$_r$ (1:1000, sérum de souris), l'énolase a une expression constitutive avec un marquage plus spécifique pour le noyau au travers du cycle intracellulaire d'*E. tenella*. Les anticorps primaires sont révélés avec des anticorps α-lapin couplés à l'Alexa 488 (1:1000, Invitrogen, USA) et des anticorps α-souris couplés à l'Alexa 594 (1:1000, Invitrogen, USA). Les lamelles sont mises en contact avec du Vectashield contenant 1,5 µg/mL de DAPI (Clinisciences, France). Les cellules sont ensuite observées au microscope à fluorescence (Zeiss Axiovert 200 microscope, Carl Zeiss, Allemagne).

Analyses statistiques

Les différences intergroupe (p value) sont évaluées par un test de Student apparié. La limite de significativité a été fixée à p = 0,05.

c. Résultats

Effets de la bestatine sur le cycle intracellulaire d'*E. tenella*

Pour évaluer l'importance des métallo-protéases dans le cycle biologique d'*E. tenella*, nous nous sommes spécifiquement intéressés à deux stades : le stade intracellulaire, plus particulièrement, aux processus d'invasion et de développement des sporozoïtes, et le stade extracellulaire qui correspond à la sporulation. Nous avons d'abord adressé le rôle des aminopeptidases dans les processus d'invasion et de développement d'*E. tenella*. Des cellules MDBK ont été infectées avec des sporozoïtes, exprimant de manière stable le marqueur YFP, en présence ou en absence de la bestatine, un inhibiteur d'aminopeptidases (Figure 26).

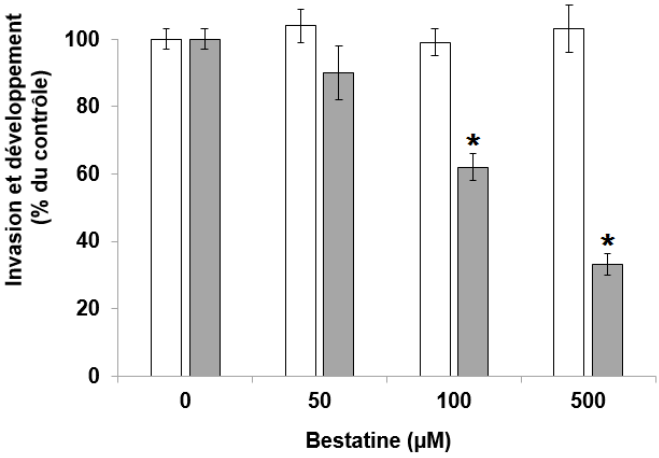


Figure 26 : La bestatine inhibe le développement d'*E. tenella*

Le rôle des aminopeptidases parasitaires dans l'invasion (□) et dans le développement (■) a été évalué en ajoutant de la bestatine dans le milieu culture de cellules MDBK infectées par *E. tenella*. Les pourcentages d'invasion et développement ont ensuite été calculés. Les valeurs reportées sont des moyennes de trois expériences ± l'écart type. Les données ont été analysées par un test de Student apparié, (* *p<0,001*).

Les cellules sont infectées par des sporozoïtes en présence de différentes concentrations de bestatine (50 - 500 µM) pendant 4 h pour les tests d'invasion et 96 h pour les tests de développement. En l'absence d'inhibiteur, des parasites intracellulaires sont observés à 4 h p.i et des mérozoïtes sont observés dans le surnageant de culture à 96 h p.i. L'addition de bestatine n'affecte pas l'invasion cellulaire. En revanche, elle réduit significativement ($p < 0,001$) le nombre de mérozoïtes libérés dans le milieu et ce, de manière dose dépendante (40 % et 70 % d'inhibition pour 100 et 500 µM respectivement). Ces données montrent qu'au moins une aminopeptidase d'*E. tenella* est impliquée et joue un rôle clef dans le développement intracellulaire du parasite. Les oocystes d'*E. tenella* sont imperméables à la bestatine, l'implication des aminopeptidases pendant la sporulation a donc été étudiée sur des lysats d'oocystes à l'aide d'un substrat fluorescent.

Détection d'une activité de type aminopeptidase au cours la sporulation d'*E. tenella*

Pour étudier l'expression des aminopeptidases pendant la sporulation, nous avons réalisé des tests biochimiques sur des lysats d'oocystes prélevés à 0, 6, 12, 24, 48 et 72 h après l'initiation de la sporulation. Pour enregistrer l'activité, les lysats ont été incubés en présence d'un substrat spécifique des aminopeptidases, l'H-Ala-AMC. Une activité de type aminopeptidase est détectée dans chaque lysat d'oocystes au cours de la sporulation (Figure 27A). Une augmentation significative de l'activité (1,4 fois ; $p < 0,001$) est observée à 6 h et 12 h de sporulation. Cette augmentation est suivie d'une diminution croissante de l'hydrolyse du H-Ala-AMC jusqu'à 48 h où l'activité persiste à une valeur stable jusqu'à la fin de la sporulation des oocystes.

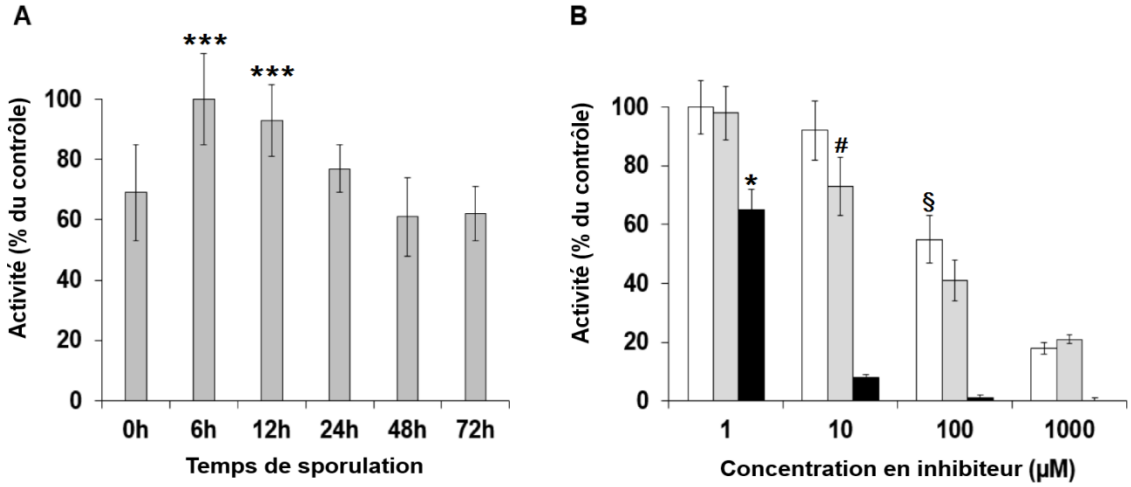


Figure 27 : Une activité amino-protéasique est détectée dans un lysat d'oocystes

A, Profil d'activité de type aminopeptidase contre l'H-Ala-AMC pendant la sporulation. L'activité aminopeptidase a été évaluée sur des lysats prélevés à différents temps après l'initiation de la sporulation. Les données ont été analysées par rapport au lysat d'oocystes non sporulés par un test de Student apparié (*** *p<0,001*). *B,* Effets des inhibiteurs d'aminopeptidases sur l'activité d'un lysat d'oocystes non sporulés contre le substrat fluorescent H-Ala-AMC. L'effet de la 1,10-ortho-phénanthroline (□), la bestatine (▨), et de l'amastatine (■) a été évalué sur un lysat d'oocystes non sporulés. Les valeurs correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes. Les données ont été analysées et comparées au lysat d'oocystes non sporulés non traités par un test de Student apparié (* *p<0,001* pour l'amastatine, # *p<0,05* pour la bestatine et § *p<0,001* pour la 1,10-ortho-phénantroline).

La pré-incubation du lysat d'oocystes non sporulés avec des inhibiteurs spécifiques de métallo-protéases (bestatine, 1,10-ortho-phénantroline, amastatine) résulte en une inhibition significative et dose dépendante de l'activité enregistrée (Figure 27B). L'ensemble de ces données suggère qu'une ou plusieurs aminopeptidase(s) neutre(s) sont actives pendant la sporulation d'*E. tenella*.

Identification de l'aminopeptidase active pendant la sporulation

Pour visualiser le profil d'activité des aminopeptidases actives pendant la sporulation, nous avons réalisé une analyse par zymographie native. Des lysats d'oocystes ont été chargés sur un gel de polyacrylamide natif contenant le substrat H-Ala-AMC. Nous avons révélé la présence d'une bande à un poids moléculaire apparent de ~ 95 kDa, dont l'intensité augmente graduellement au cours de la sporulation (Figure 28A).

A



B

Identification	Nombre de hit	Couverture (%)
Et-ApN1	48	56.90
HSP 70	10	15.40
Enolase	2	7.74
Et-ApN2	0	0

Figure 28 : Suivi de l'activité aminopeptidase et identification d'*Et*-ApN1

A, Profil d'activité au cours de la sporulation par zymographie native. Les protéines des lysats ont été séparées sur un gel natif de polyacrylamide contenant 200 µM d'H-Ala-AMC et observé sous UV. *B*, Identification de la protéase active après fractionnement. "Hits" sont les fragments peptidiques générés par digestion trypsique et analysées par spectrométrie de masse possédant une homologie de 100 % avec la séquence de référence. "Couverture" est l'homologie totale avec les séquences complètes des protéines détectées

Pour identifier les aminopeptidases actives responsables de l'activité, nous avons effectué un fractionnement protéique du lysat d'oocystes. L'activité aminopeptidase a été suivie en parallèle grâce à l'H-Ala-AMC. La purification a révélé que la protéase possède un point isoélectrique compris entre 5,2 et 5,5 et un poids moléculaire compris entre 85 et 120 kDa (Figure 29). Ce résultat est cohérent avec le poids moléculaire observé par zymographie (Figure 28A). L'utilisation de la zymographie en dernière étape de purification nous a permis d'exciser spécifiquement la bande d'intérêt sans avoir recours à une coloration à l'argent. Les analyses de spectrométrie de masse, sur la bande excisée, couplées aux recherches dans les banques de données *Alveolata* de NCBI et de MASCOT nous ont permis d'identifier la protéine active comme une homologue de l'aminopeptidase N (famille M1) de *T. gondii*. Nous avons identifié dans le génome d'*E. tenella* deux gènes codant pour des aminopeptidases N (*Et*-ApN) (*Et*-ApN1 : ETH_00013105 et *Et*-ApN2 ETH_00015595). Les 48 peptides fragmentés obtenus par spectrométrie de masse couvrent 56,9 % de la séquence complète d'*Et*-ApN1. En revanche, aucun fragment n'appartient à *Et*-ApN2 (Figure 28B).

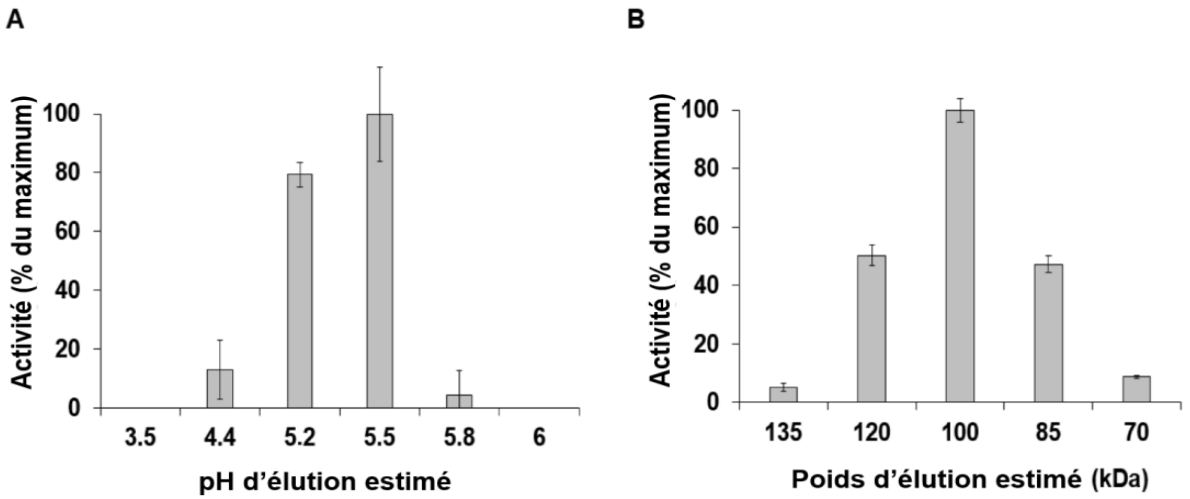


Figure 29 : Suivi de l'activité aminopeptidase pendant le fractionnement

A, L'activité aminopeptidase a été enregistrée, en présence de 20 µM d'H-Ala-AMC, pour chaque fraction récupérée après l'isoélectrofocalisation. Le pH de chaque fraction a été déterminé. *B*, L'activité aminopeptidase a été enregistrée, en présence de 20 µM d'H-Ala-AMC, pour chaque fraction recueillie après l'isoélectrofocalisation et l'exclusion de masse. Le poids moléculaire de chaque fraction a été déterminé. Les activités sont exprimées en pourcentage de l'activité maximale. Les valeurs reportées correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes ± l'écart type.

Alignements des séquences protéiques des aminopeptidases N d'*E. tenella* avec les membres de la famille des métallo-protéases M1.

Dans le but d'étudier l'homologie entre *Et*-ApN1 et les aminopeptidases N-like des parasites, nous avons cloné et séquencé le gène codant pour l'aminopeptidase N1 d'*E. tenella*. La séquence codante d'*Et*-ApN1 contient 249 pb supplémentaires à l'extrémité N-terminale par rapport à la séquence prédite (ETH_00013105). Un alignement des séquences en acides aminés a été généré en utilisant les séquences prédites d'*Et*-ApN2 et des aminopeptidases N de *T. gondii* et de *N. caninum*, la nouvelle séquence d'*Et*-ApN1 et les séquences des métallo-protéases M1 de *P. falciparum*, de *C. parvum* et des aminopeptidases N d'*E.coli*, de *S. cerevisiae* et de *H. sapiens* (Figure 30A). Le site actif de ces métallo-enzymes est caractérisé par deux motifs : 1, le motif $HExxHx_{18}E$ dans lequel les histidines (H) jouent un rôle de ligands pour les ions zinc et le premier résidu d'acide glutamique (E) est important pour l'activité enzymatique (Rawlings and Barrett 1993; Florent, Derhy *et al.* 1998), 2, le motif GAMEN, qui permet de différencier les aminopeptidases des leucotriènes A4 hydrolases dans la famille M1 (Rawlings and Barrett 1995). Le motif $HExxHx_{18}E$ se trouve entre les positions 510 et 533 d'*Et*-ApN1 et n'est pas retrouvé dans la séquence prédite d'*Et*-ApN2. Le motif GAMEN est également conservé pour *Et*-ApN1 et est présent entre les positions 474 et 478. Le motif GAMEN n'est pas détecté dans la séquence prédite d'*Et*-ApN2.

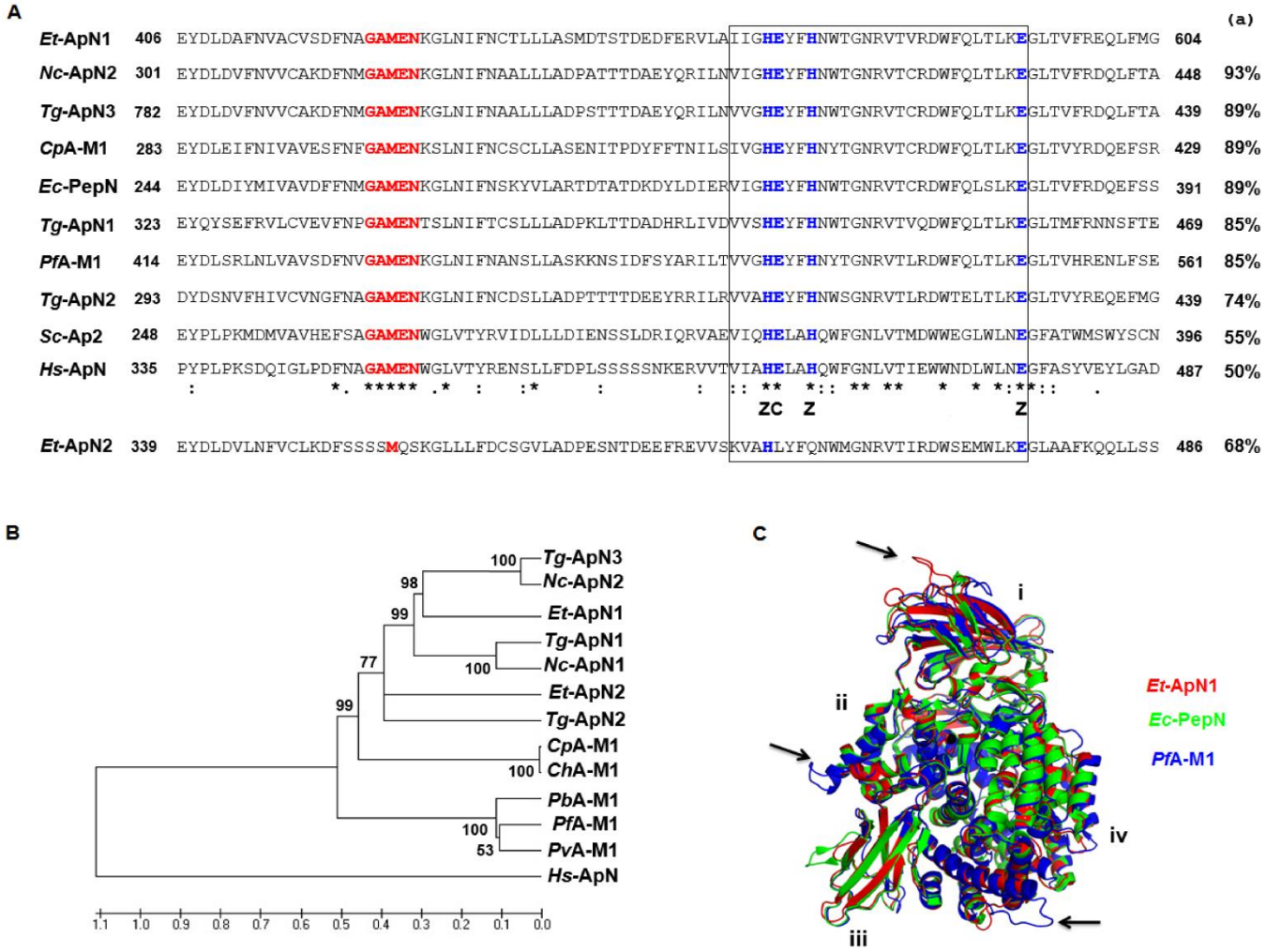


Figure 30 : Comparaison des aminopeptidases N avec *Et*-ApN1 d'*E. tenella*

Alignement multiple de la séquence du site actif (région encadrée) et des acides aminés flanquants des membres de la famille *Et*-ApN (*Et*-ApN1 KF602061, et *Et*-ApN2 ETH_00015595), et quelques membres sélectionnés de la famille M1 zinc-métallo-protéases (*P. falciparum Pf*A-M1 Y09081; *E. coli* ApN, NP_415452.1; *S. cerevisiae* Ala/Arg aminopeptidase NP_011913.1; *H. sapiens* ApN, NP_001141.2). Les acides aminés identiques (*) et conservés (.) entre toutes les séquences sont indiqués. Les positions des sites de liaison au zinc (Z), du résidu glutamate requis pour l'activité catalytique (C) et du donneur de protons (P) sont indiquées en gras. Le pourcentage d'identité dans la région encadrée, entre les acides aminés d'une séquence donnée et *Et*-ApN1, est indiqué en (a). Les motifs GAMEN et $HExxHx_{18}E$ sont indiqués en rouge et en bleu respectivement. *B,* Arbre phylogénétique des aminopeptidases N des parasites apicomplexes. L'arbre a été obtenu en utilisant le programme MEGA 5 avec un alignement de type « Muscle » et une méthode de neighbor joining , le bootstrap a été calculé à partir de 10000 ré-échantillonnages. Les séquences prédites proviennent de la base de données Toxodb pour *E. tenella Et*-ApN2 (ETH_00015595), *Toxoplasma* and *Neospora* aminopeptidases N (*Tg*-ApN1: TGME49_224460, *Tg*-ApN2: TGME49_224350, *Tg*-ApN3: TGME49_221310, *Nc*-ApN1: NCLIV_048230, *Nc*-ApN3: NCLIV_048240). Les séquences d'*E. tenella Et*-ApN1 (KF602061), *Cryptosporidium* et *Plasmodium* zinc-métallo-peptidases (*C. hominis*: XP_668534.1, *C. parvum*: Xp_627236.1, *P. falciparum*: Y09081, *P. vivax*: XP_001617047, *P. berghei*: XP_680130.1) proviennent de NCBI. L'aminopeptidase N humaine (NP_01141.2) a été utilisée comme "outgroup". *C***,** Comparaison du modèle d'Et-ApN1 (rouge) avec la structure crystallographique d'*E. coli* ApN (PDB 3B34, vert) et *P. falciparum Pf*A-M1 (PDB 3EBG, bleu). Les régions ou les structures sont variables sont indiquées par des flèches. Les différents domaines sont indiqués par leurs numéros (i, ii, iii et iv).

L'arbre phylogénétique a révélé que *Et*-ApN1 est proche des aminopeptidases N de *T. gondii* (*Tg*-ApN1) et *N. caninum* (*Nc*-ApN1). Ces 3 coccidies possèdent plus d'une aminopeptidase N contrairement à *Plasmodium spp.* et à *Cryptosporidium spp.* (Figure 30B). Pour évaluer les similarités entre *Et*-ApN1 et les autres alanyl-aminopeptidases, nous avons généré un modèle 3D de la protéine (Figure 30C). Ce modèle possède une organisation typique des alanyl-aminopeptidases bactériennes avec 4 domaines (Addlagatta, Gay *et al.* 2008). Le site actif, le site de liaison du zinc et le motif GAMEN sont localisés dans le domaine II. Ce domaine est conservé au sein de la famille des métallo-protéases M1. Le modèle 3D d'*Et*-ApN1 possède une bonne homologie avec l'enzyme d'*E. coli* (0,23 r.m.s.d. sur 4105 atomes) et celle de *P. falciparum* (1,2 r.m.s.d. sur 4462 atomes). Pour ces trois enzymes, une variabilité de structure est essentiellement observée dans le domaine I et les hélices du domaine IV (Figure 30C).

« Fingerprinting » de l'activité d'*Et*-ApN1$_r$ et comparaison avec *Pf*A-M1$_r$.

Comme *Et*-ApN1 et *Pf*A-M1 possèdent des structures similaires, nous avons étudié et comparé leurs propriétés biochimiques. Nous avons produit la forme active complète de la protéine recombinante d'*Et*-ApN1 (Et-ApN1$_r$) dans *E. coli* comme décrit par Ragheb *et al.* (Ragheb, Dalal *et al.* 2011). La masse apparente d'*Et*-ApN1$_r$ a été vérifiée par western blot (102 kDa) et l'activité protéolytique contre le H-Ala-AMC par zymographie (Figure 31). Les tests d'inhibition avec des inhibiteurs génériques d'aminopeptidases (la bestatine et l'amastatine) ont montré une réduction significative et dose dépendante de l'activité d'*Et*-ApN1$_r$ ($p < 0,001$ à 1 µM pour les deux inhibiteurs). Aucun effet significatif n'est observé avec des inhibiteurs de protéases à cystéine et à sérine (AEBSF et E64) (Figure 29A).

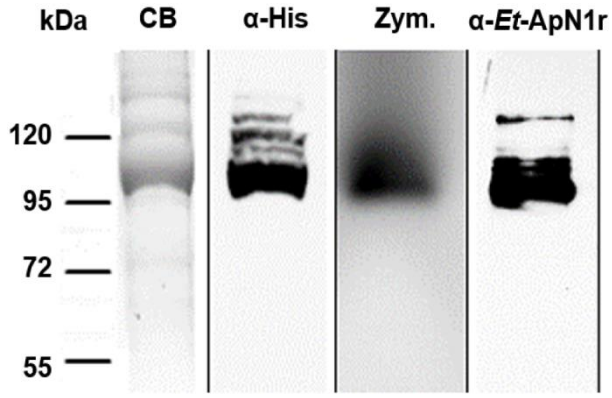


Figure 31 : Purification de *Et*-ApN1$_r$

Bleu de coomassie (CB), Western blot avec des anticorps anti-His (α-His), zymographie native (Zym.) réalisés avec la protéine recombinante *Et*-ApN1$_r$ 6xHis-taggée. Le poids moléculaire estimé est de 102 kDa. La protéine a été injectée à des lapins pour produire des anticorps anti *Et*-ApN1. Ces anticorps ont été testés contre la protéine recombinante (α-*Et*-ApN1r).

Pour déterminer les cofacteurs métalliques nécessaires à l'activité enzymatique de l'*Et*-ApN1, nous avons étudié la capacité d'ions métalliques bivalents à restaurer l'activité après une déplétion en ions (Allary, Schrevel *et al.* 2002). Après traitement avec la 1,10-ortho-phénantroline (1mM), *Et*-ApN1$_r$ présente une activité réduite de 92 %. Cette activité est partiellement restaurée par l'ajout d'ions Zn^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+} et Fe^{2+}. Les ions Zn^{2+} sont les plus efficaces pour restaurer l'activité. Par contre, la capacité de restauration des ions Co^{2+} et Cu^{2+} est négligeable (Figure 32B).

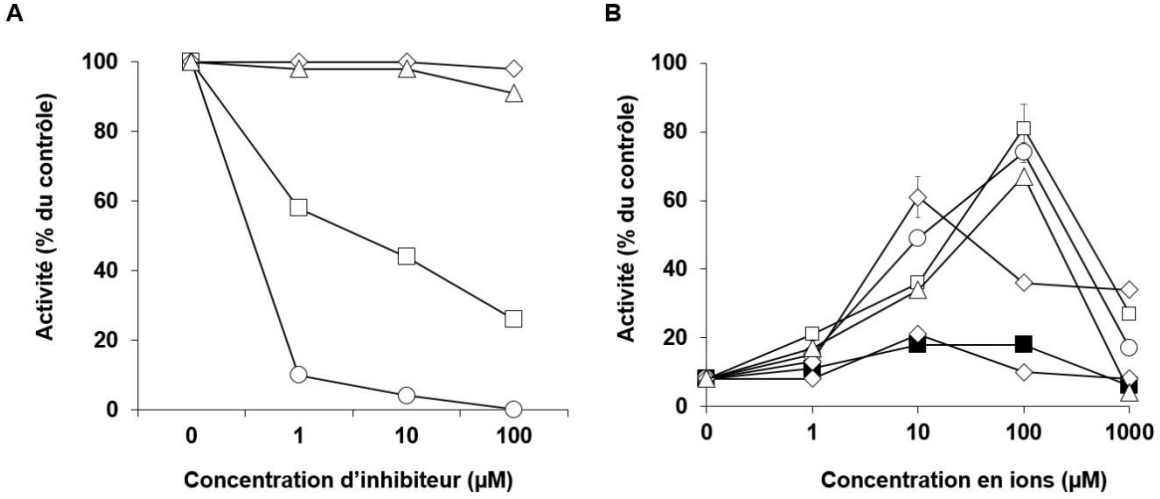


Figure 32 : Inhibition et restauration par des cations de l'activité d'*Et*-ApN1$_r$

A, Inhibition d'*Et*-ApN1r. *Et*-ApN1r a été incubée avec de la bestatine (□), de l'amastatine (○), de l'E64 (◇) et de l'AEBSF (△) à différentes concentrations (1- 100 µM) 10 min avant ajout d'H-Ala-AMC (20 µM). L'activité résiduelle est exprimée en % de l'activité sans inhibiteur. *B*, Restauration de l'activité *Et*-ApN1r par des ions. L'activité de *Et*-ApN1r a été inhibée avec de la 1,10-ortho-phénanthroline (10 mM) et dialysé. Pour restaurer l'activité, différentes concentrations (1 – 1000 µM) de Zn^{2+} (□), Cu^{2+} (■), Co^{2+} (◇), Mg^{2+} (○), Mn^{2+} (◇), Fe^{2+} (△) ont été ajoutées. L'activité obtenue est exprimée en % de l'activité sans inhibiteur et sans ion. Les valeurs reportées correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes ± l'écart type.

Pour évaluer la spécificité d'*Et*-ApN1$_r$ pour les acides aminés N-terminaux, nous avons réalisé un « fingerprinting » d'*Et*-ApN1$_r$ en utilisant une banque d'acides aminés naturels et non-naturels comme décrit précédemment (Drag, Bogyo *et al.* 2010; Poreba, McGowan *et al.* 2012). Le profil de « fingerprinting » obtenu montre que la spécificité d'acides aminés d'*Et*-ApN1$_r$ est très proche de celle de *Pf*A-M1$_r$ (Figure 33). L'acide aminé naturel le plus affin avec *Et*-ApN1$_r$ est la méthionine, avec une activité égale à 78 % de l'activité maximale (AM). *Et*-ApN1$_r$ hydrolyse également l'alanine, l'arginine et la leucine (entre 32 et 36 % AM). La glutamine, la lysine et le tryptophane sont également hydrolysés mais à des taux plus faibles (~ 15 % AM). L'activité d'*Et*-ApN1$_r$ contre les autres acides aminés naturels est négligeable.

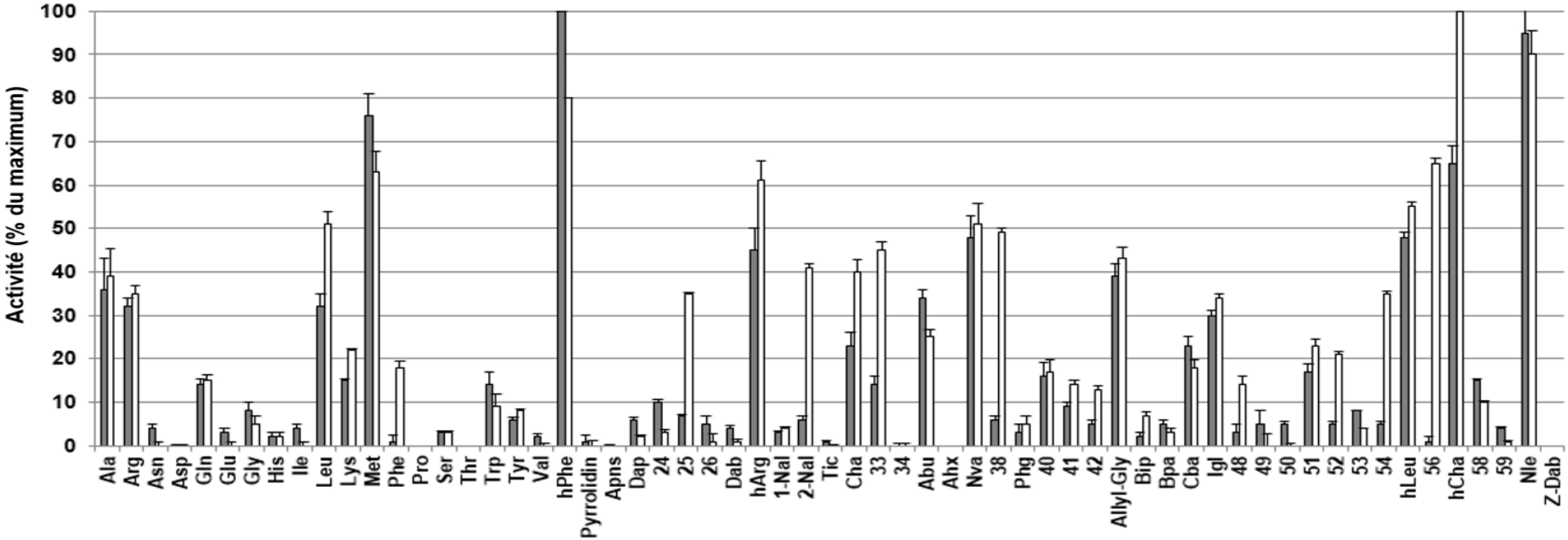


Figure 33 : Comparaison des « fingerprinting » d'*Et*-ApN1$_r$ et *Pf*A-M1$_r$

Préférence individuelle en position S1 de la protéine recombinante *Et*-ApN1$_r$ contre des acides aminés naturels et non-naturels. Criblage des 61 membres de la banque. La préférence en position P1 en acide aminé d'*Et*-ApN1r (■) et de *Pf*A-M1r (□) est comparée. Sur l'axe des x sont indiqués les abréviations ou les numéros des acides aminés et sur l'axe y la valeur de l'activité, exprimée en % de l'activité avec le substrat le plus hydrolysé par *Et*-ApN1r. Les valeurs reportées correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes ± l'écart type.

Comme observé pour *Pf*A-M1$_r$, l'analyse de l'ensemble de la banque a révélé qu'*Et*-ApN1$_r$ possède un large spectre d'activité contre des acides aminés non-naturels. Les résidus hPhe, Nle et hTyr sont favorisés en position P1 en comparaison avec la méthionine (100, 95 et 77 % AM, respectivement). Les substrats avec en position P1 les résidus hCha, Nva, hLeu, hArg, Allyl-Gly et Abu sont également hydrolysés par *Et*-ApN1$_r$ (avec une AM variant de 35 à 65 %). Tous les autres substrats présentant des acides aminés non naturels en position P1 ont une activité inférieure à 30 % AM. Les résidus homo-dérivés possèdent plus d'affinité pour *Et*-ApN1$_r$ que les acides-aminés naturels correspondant, favorisant ainsi l'activité (hArg +11 %, hLeu +17 %, hCha +48 % et la meilleure augmentation pour le hPhe avec +98 % AM). Ces résultats démontrent que la poche S1 est profonde et volumineuse.

	***E. tenella Et*-ApN1r**			***P. falciparum Pf*A-M1r[a]**		
Substrat	K_m µM	k_{cat} s^{-1}	k_{cat}/K_m mM^{-1} s^{-1}	K_m µM	k_{cat} s^{-1}	k_{cat}/K_m mM^{-1} s^{-1}
Nle-AAC	16.5 ± 2.9	0.710 ± 0.030	43.0 ± 0.2	110.1 ± 13.6	1.399 ± 0.119	12.7 ± 0.1
hPhe-AAC	26.2 ± 8.9	0.836 ± 0.056	31.9 ± 0.2	60.8 ± 3.1	0.978 ± 0.003	16.1 ± 0.1
hCha-AAC	23.6 ± 3.9	0.737 ± 0.156	31.3 ± 0.7	96.3 ± 16.2	1.592 ± 0.230	16.5 ± 0.2
Met-AAC	31.4 ± 7.7	0.704 ± 0.180	22.4 ± 0.5	138.2 ± 7.9	0.887 ± 0.077	6.4 ± 0.1
hArg-AAC	27.7 ± 2.2	0.575 ± 0.009	20.8 ± 0.1	124.3 ± 15.6	1.144 ± 0.100	9.2 ± 0.1
styryl-Ala-AAC	30.2 ± 7.0	0.577 ± 0.162	19.1 ± 0.5	192.7 ± 10.5	0.937 ± 0.154	4.9 ± 0.1
Nva-AAC	35.4 ± 12.5	0.658 ± 0.087	18.6 ± 0.2	267.1 ± 7.7	2.786 ± 0.228	10.4 ± 0.1
Ala-AAC	59.8 ± 4.9	0.456 ± 0.033	7.6 ± 0.1	240.6 ± 10.9	1.054 ± 0.154	4.4 ± 0.1

Tableau 9 : Spécificité enzymatique d'*Et*-ApN1$_r$ et *Pf*A-M1$_r$ sur les meilleurs substrats

Comparaison des paramètres cinétiques (K_m, k_{cat}, k_{cat}/K_m) des substrats sélectionnés pour *Et*-ApN1r et *Pf*A-M1r ; a: adapté de (Poreba, McGowan *et al.* 2012). Les valeurs reportées correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes ± l'écart type.

Nous avons également déterminé les paramètres cinétiques (constante de Michaelis, K_m ; constante catalytique, k_{cat} et la constante de spécificité, k_{cat}/ K_m) d'*Et*-ApN1$_r$ contre un panel des acides aminés les plus hydrolysés. Ces résultats ont été comparés à ceux obtenus avec *Pf*A-M1$_r$ par Poreba *et al.* (2012) (Tableau 9). Cette comparaison montre que les constantes d'affinité pour les substrats testés sont plus faibles pour *Et*-ApN1r (16,5 <K_m<59,8 µM) que pour *Pf*A-M1$_r$ (60,8 <K_m<267,1 µM). Par exemple, pour le résidu Nle, le K_m d'*Et*-ApN1$_r$ est de 16,5 µM alors qu'il est de 110,1 µM pour *Pf*A-M1r, ou encore pour le résidu Nva, les K_m sont de 35,4 µM et 267,1 µM pour *Et*-ApN1$_r$ et *Pf*A-M1$_r$ respectivement. *Et*-ApN1$_r$ est donc un peu plus affin que *Pf*A-M1$_r$ pour les substrats testés (Nle, hPhe, hCha, Met, hArg, styryl-Ala, Nva et Ala). Les constantes catalytiques (k_{cat}) d'*Et*-ApN1$_r$ sont environ deux fois plus faibles pour les substrats sélectionnés que celles rapportées avec *Pf*A-M1$_r$ (par exemple,

pour le résidu Nle, le k_{cat} est de 0,710 s^{-1} pour *Et*-ApN1$_r$ et 1,399 s^{-1} pour *Pf*A-M1$_r$. La différence la plus importante est observée pour le résidu Nva dont la valeur du k_{cat} d'*Et*-ApN1$_r$ est 4,2 fois supérieure à celle de *Pf*A-M1$_r$ (0,658 s^{-1} *vs* 2,786 s^{-1}). Ces résultats indiquent que la réaction d'hydrolyse est légèrement plus rapide avec *Et*-ApN1$_r$ que *Pf*A-M1$_r$ pour les substrats sélectionnés. Les constantes de spécificité (k_{cat}/K_m) sont supérieures pour *Et*-ApN1 en comparaison avec *Pf*A-M1$_r$, suggérant qu'*Et*-ApN1 est légèrement plus efficace que *Pf*A-M1 pour hydrolyser les substrats sélectionnés.

Profil d'expression et localisation d'*Et*-ApN1 au cours du cycle biologique d'*E. tenella*

Pour obtenir des informations sur les fonctions biologiques d'*Et*-ApN1, nous avons d'abord réalisé son profil de transcription par RT-PCR à partir d'ARN totaux d'oocystes à 3 temps différents de sporulation : non sporulé (0 h), partiellement sporulé (12 h), totalement sporulé (72h), ainsi qu'à partir d'ARN de mérozoïtes de 2ème génération et de gamètes (Figure 34A). Le gène codant pour l'actine a été utilisée comme gène de ménage, un signal est détecté dans chaque condition. Parmi les deux gènes d'aminopeptidases testées (*Et*-ApN1 et *Et*-ApN2), seul *Et*-ApN1 est exprimé au cours de la sporulation. Un faible signal est également détecté dans les mérozoïtes de 2ème génération et les gamètes. En revanche, aucune amplification n'est observée pour *Et*-ApN2 au cours de la sporulation ni dans les mérozoïtes de 2ème génération ou les gamètes.

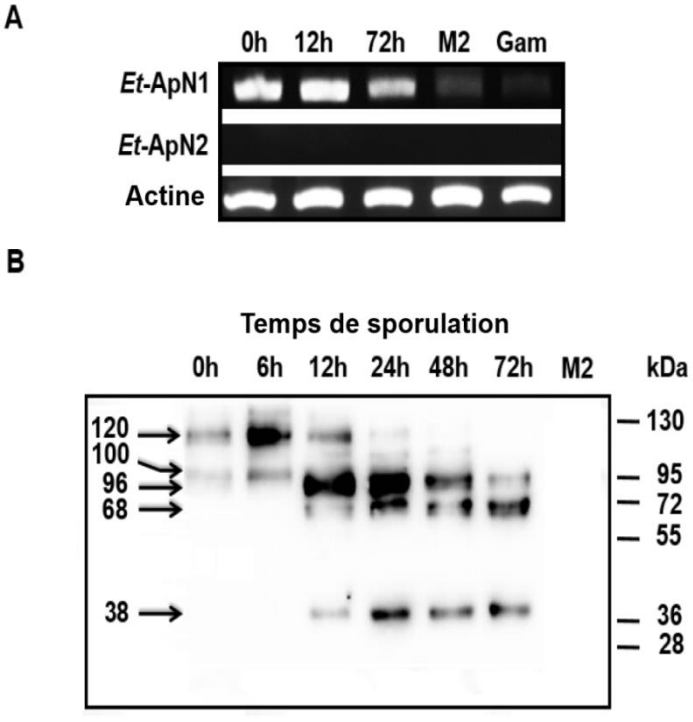


Figure 34 : Profil de transcription et d'expression d'*Et*-ApN1

A, Profil de transcription des aminopeptidases N pendant le cycle biologique d'*E. tenella*. La RT-PCR a été réalisée à partir d'ARN totaux d'oocystes prélevés à différents temps de sporulation; non sporulé (0 h); partiellement sporulé (12 h) et sporulé (72 h); de mérozoïtes (M2) et de gamètes (Choy, Bryant *et al.*). Le gène codant pour l'actine est utilisé comme gène de ménage. *B*, Clivage d'*Et*-ApN1. Des lysats d'oocystes prélevés à différents temps de sporulation (0, 6, 12, 24, 48, and 72 h) et de mérozoïtes (M2) ont été marqués par immuno-blotting avec des anticorps Lα-*Et*-ApN1.

En utilisant la protéine recombinante, nous avons produit des anticorps polyclonaux Lα-*Et*-ApN1r nous permettant d'analyser par western blot, le profil d'*Et*-ApN1 au cours de la sporulation (0, 6, 12, 24, 48, et 72 h) et dans les mérozoïtes de 2ème génération (Figure 34B). Le gène *Et*-ApN1 code pour une protéine de 1093 acides aminés avec un poids moléculaire prédit de 121 kDa. Par western blot, nous observons jusqu'à 5 formes d'*Et*-ApN1 (120, 100, 96, 68 et 38 kDa) pendant la sporulation. Dans l'oocyste non sporulé, deux bandes sont observées : la première de 120 kDa correspond à la forme complète d'*Et*-ApN1 et une forme d'environ 100 kDa. Six heures après le début de la sporulation, il est observé une augmentation de l'intensité de la forme de 120 kDa, suggérant une synthèse d'*Et*-ApN1 au début de la sporulation. À partir de 12 h, l'intensité du signal à 120 kDa diminue au profit d'une nouvelle bande à 96 kDa. À 24 h, les formes à 96, 68 et 38 kDa sont prédominantes. À 48 h, l'intensité des formes de hauts poids moléculaires (120, 100 et 96 kDa) diminue alors que l'intensité des bandes à 68 et 38 kDa augmente. A la fin de la sporulation, seules les formes de 96, 68 et 38 kDa sont présentes. Aucun signal n'est détecté dans les mérozoïtes de 2ème génération. Ces données suggèrent que la forme de 120 kDa subit des hydrolyses séquentielles permettant le passage de 100 kDa à 96 kDa puis aux formes de 68 et 38 kDa. Ces résultats montrent qu'*Et*-ApN1 est synthétisée et clivée pendant la sporulation.

Pour étudier la présence d'*Et*-ApN1 dans la partie intracellulaire du cycle *d'E. tenella*, nous avons localisé *Et*-ApN1 pendant le développement intracellulaire du parasite en modèle *in vitro*. Des cellules MDBK et PCKC ont été infectées avec des parasites et fixées à différents temps après l'invasion. Les MDBK et des sporozoïtes de la souche Wis ont été utilisés pour étudier les premières étapes du développement. Le modèle cellulaire des MDBK ne permettant le développement du parasite que jusqu'à la libération des mérozoïtes de 1ère génération, les cellules PCKC ont été utilisées pour la production des mérozoïtes de 2ème génération. Comme les cultures primaires ont une durée de vie très limitée, nous avons utilisé des sporozoïtes de la souche Wis96 pour obtenir une formation plus rapide des gamètes. Des tests d'immunofluorescence indirects ont été réalisés avec les anticorps polyclonaux Lα-*Et*-ApN1$_r$ (Figure 35). Des anticorps Sα-énolase$_r$ ont été utilisés comme contrôle : ils marquent le noyau du parasite dans divers stades parasitaires (Labbé, Péroval *et al.* 2006). À 4 h p.i. *Et*-ApN1 est majoritairement détectée de manière ponctuée dans le cytoplasme du sporozoïte et partiellement dans le noyau. À 16 h p.i., la majorité du signal est co-localisé avec celui de l'énolase dans le noyau, suggérant qu'*Et*-ApN1 transite du cytoplasme vers le noyau du parasite. À 24 h p.i., le signal d'*Et*-ApN1 est toujours détecté dans le noyau de manière moins

importante, avec une augmentation du signal cytoplasmique. *Et*-ApN1 n'est pas détectée dans les mérozoïtes de 2ème génération. Cette observation est cohérente avec les analyses par western blot. Un marquage d'*Et*-ApN1 est également observé dans les macro et microgamètes, avec un net marquage péri-nucléaire des microgamètes.

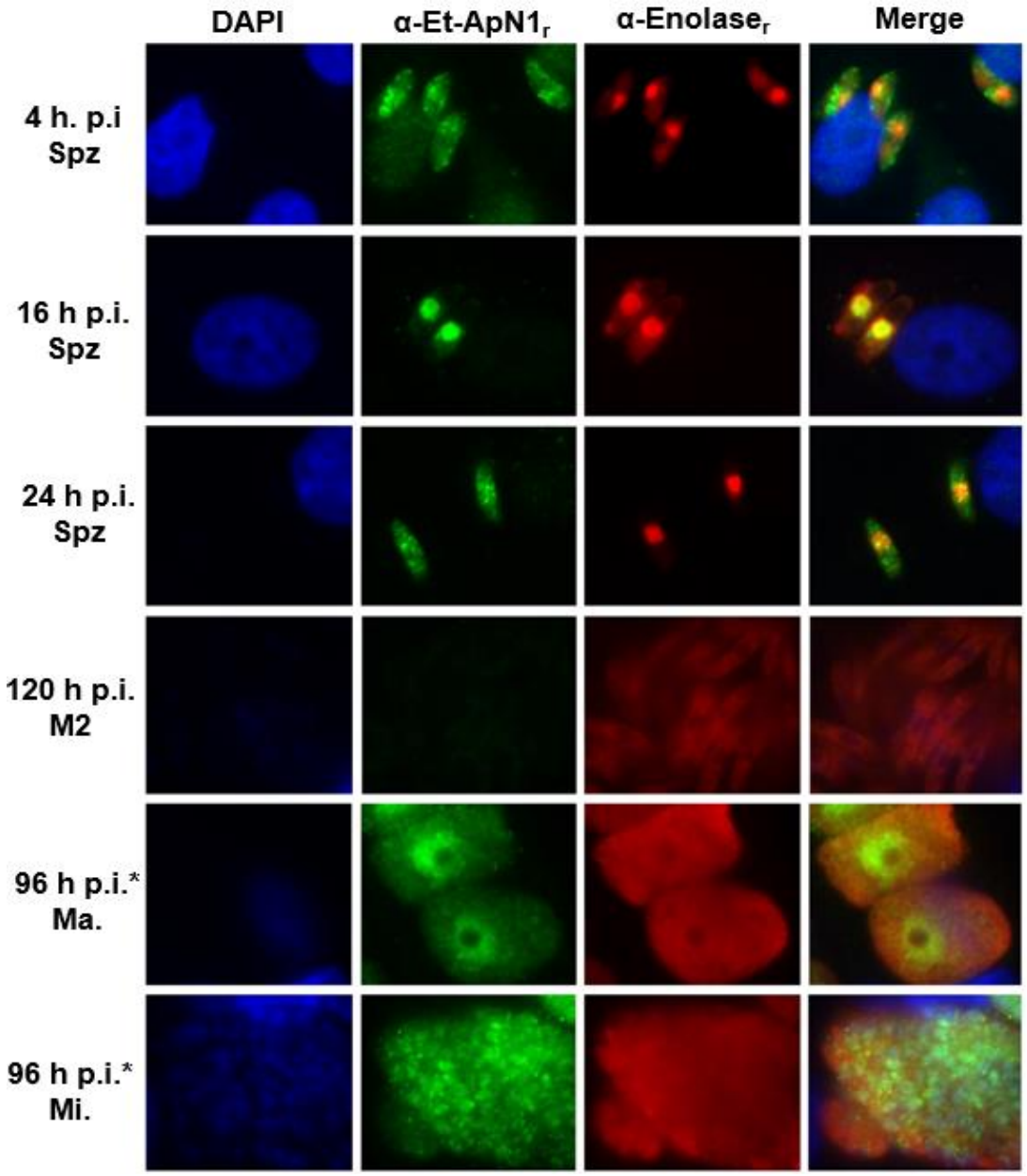


Figure 35 : *Et*-ApN1 transite à travers le noyau du parasite pendant les phases précoces du développement

Des cellules MDBK et une culture primaire PCKC ont été infectées avec les souches *E. tenella* Wis et Wis 96 (*), respectivement et fixées avec du PAF 2.7 %. Les cellules MDBK ont été fixées à 4 h, 16 h et 24 h post infection (p.i.) par des sporozoïtes de la souche Wis. Les mérozoïtes (M2) et les gamètes (Ma : Macrogamète, Mi : Microgamète) ont été obtenus grâce au modèle de cellules primaires PCKC infectées respectivement avec des sporozoïtes de la souche Wis et Wis96. Les parasites ont été marqués avec des anticorps Mα-énolase$_r$ (Labbé, Péroval *et al.* 2006) et Rα-*Et*-ApN1$_r$; le noyau des cellules a été marqué au DAPI.

d. Discussion et conclusion

Des activités de type aminopeptidase M1 ont été décrites chez de nombreux parasites apicomplexes incluant *Plasmodium* (Florent, Derhy *et al.* 1998), *Toxoplasma* (Berthonneau, Rodier *et al.* 2000), *Cryptosporidium* (Padda, Tsai *et al.* 2002) et *Eimeria* (Fetterer, Miska *et al.* 2005). Des études ont confirmé le rôle crucial de l'unique membre de la famille M1 des métallo-protéases de *P. falciparum*, *Pf*A-M1, dans le métabolisme et le développement (Allary, Schrevel *et al.* 2002; Azimzadeh, Sow *et al.* 2010; Harbut, Velmourougane *et al.* 2011; Ragheb, Dalal *et al.* 2011). Nos travaux révèlent qu'*Et*-ApN1, l'homologue de *Pf*A-M1 du parasite *E. tenella*, possède de fortes homologies avec l'enzyme plasmodiale au niveau des structures primaires et secondaires, mais également au niveau des paramètres cinétiques, du profil de clivage et de la localisation subcellulaire, suggérant une forte conservation des fonctions des aminopeptidases entre les deux espèces. *Et*-ApN1 a précédemment été identifiée comme une protéase active au cours de la sporulation (Fetterer, Miska *et al.* 2005), cette observation est confirmée par nos résultats. Le fait qu'*Et*-ApN1 soit présente et active à la fin de la sporulation et que les aminopeptidases N d'autres parasites apicomplexes soient impliquées dans le développement et le métabolisme, suggèrent qu'*Et*-ApN1 pourrait potentiellement jouer un rôle important dans les stades intracellulaires. Dans ce travail, nous nous sommes appuyés sur les données des nombreuses études menées sur *Pf*A-M1 pour interpréter les résultats obtenus pour *Et*-ApN1.

L'implication d'activités aminopeptidases pendant le développement de *P. falciparum* a été initialement mise en évidence par l'utilisation de la bestatine, un inhibiteur d'aminopeptidases bien connu (Nankya-Kitaka, Curley *et al.* 1998). Quand la bestatine est ajoutée à des cellules MDBK infectées par *E. tenella*, une forte inhibition du développement parasitaire est observée, sans influencer l'étape d'invasion. Ces données suggèrent la présence et l'implication d'aminopeptidases homologues à celle de *P. falciparum* dans le développement d'*E. tenella*. Des études précédentes ont montré qu'au moins 3 types d'aminopeptidases de *P. falciparum* étaient impliquées dans le métabolisme et le développement du parasite (Chen, Xie *et al.* 2009; Ragheb, Bompiani *et al.* 2009; Harbut, Velmourougane *et al.* 2011; Moon, Kang *et al.* 2011). Trois homologues de ces protéases sont présents dans le génome d'*E. tenella* (Katrib, Ikin *et al.* 2012) : 2 aminopeptidases de la famille M1 (*Et*-ApN1 et *Et*-ApN2) et 1 aminopeptidase de la famille M17 (*Et*-leucyl-aminopeptidase). De manière intéressante, Fetterer *et al.* ont montré que seule *Et*-ApN1 était

transcrite dans l'oocyste sporulé un stade est pertinente pour que *Et*-ApN1 soit impliquée dans les premières étapes du développement (Fetterer, Miska *et al.* 2005). Nos données confirment cette observation. Par ailleurs, il semblerait qu'*Et*-ApN2 ne soit pas active. En effet, dans la séquence prédite, il manque les deux motifs GAMEN et $HExxHx_{18}E$, nécessaires à l'activité protéasique (Ashmun, Shapiro *et al.* 1992; Luciani, Marie-Claire *et al.* 1998). Nous émettons l'hypothèse que, comme *Pf*A-M1, *Et*-ApN1 est impliquée dans le métabolisme parasitaire et/ou le développement.

Il est important de noter qu'un seul représentant de la famille M1 est présent chez *Plasmodium* et *Cryptosporidium* contrairement à *Toxoplasma*, *Neospora* et *Eimeria*. Des études phylogénétiques complémentaires devraient être conduites pour déterminer s'il existe une duplication de gène entre ces parasites. Malgré cette différence dans le nombre de gènes, *Et*-ApN1 et *Pf*A-M1 sont très proches. Les analyses des structures secondaires, réalisées à partir des modèles 3D des deux enzymes, ont permis de montrer que les conformations d'*Et*-ApN1 et *Pf*A-M1 étaient similaires. De plus les deux protéases possèdent une préférence en acides aminés et des paramètres cinétiques très similaires.

En plus des similarités structurales entre *Et*-ApN1 et *Pf*A-M1, nos données montrent qu'il existe également des similarités sur le plan biologique entre ces deux aminopeptidases parasitaires. La première similarité concerne le clivage des enzymes. Les analyses par western blot ont révélé qu'*Et*-ApN1 est produite sous la forme d'un précurseur de 120 kDa qui est ensuite séquentiellement clivé sous différentes formes de 100, 96, 68 et 38 kDa. Ces résultats sont très similaires au profil de clivage décrit pour *Pf*A-M1 : celle-ci est synthétisée sous la forme d'un précurseur de 120 kDa qui est séquentiellement clivé en 4 formes de 100, 96, 68 et 35 kDa (Florent, Derhy *et al.* 1998; Allary, Schrevel *et al.* 2002; Azimzadeh, Sow *et al.* 2010; Ragheb, Dalal *et al.* 2011). Ces résultats suggèrent un processus de clivage similaire entre *Et*-ApN1 et *Pf*A-M1. La deuxième similarité concerne la distribution subcellulaire d'*Et*-ApN1 et *Pf*A-M1. La localisation cytoplasmique d'*Et*-ApN1, d'une manière ponctuée dans le cytoplasme, est cohérente avec les observations antérieures de *Pf*A-M1 (Florent, Derhy *et al.* 1998; Allary, Schrevel *et al.* 2002; McGowan, Porter *et al.* 2009; Azimzadeh, Sow *et al.* 2010). Il faut également noter que, comme chez *Plasmodium*, la localisation nucléaire d'*Et*-ApN1 est également conservée (Dalal and Klemba 2007; Azimzadeh, Sow *et al.* 2010; Ragheb, Dalal *et al.* 2011). L'augmentation transitoire du signal d'*Et*-ApN1 dans le noyau à

16 h suggère un rôle potentiel d'*Et*-ApN1 dans le compartiment nucléaire. Ces données sont cohérentes avec l'hypothèse proposée par (Ragheb, Dalal *et al.* 2011) d'une implication potentielle de *Pf*A-M1 dans un processus nucléaire, comme observé pour d'autres membres de la famille des aminopeptidases M1 (Constam, Tobler *et al.* 1995). Il est également intéressant de signaler que l'aminopeptidase N humaine, ApN/CD13, a aussi été localisée dans des fractions nucléaires (Larrinaga, Callado *et al.* 2005) et est impliquée dans la prolifération cellulaire (Lendeckel, Kahne *et al.* 1998; Lohn, Mueller *et al.* 2002).

La question de la différence de signal observée entre le zymogramme et le western blot réalisés à partir des mêmes échantillons reste à élucider. Une explication plausible est que le zymogramme est réalisé en condition native ce qui signifie que différentes formes d'*Et*-ApN1 peuvent migrer dans une zone de poids moléculaire similaire. Nous pensons que le signal observé correspond à la somme des signaux de 100, 96 et 68 + 38 kDa observés en western blot. En effet chez *P. falciparum* la forme de 96 kDa est clivée en 68 + 35 kDa mais ce complexe n'est séparé qu'en conditions dénaturantes (McGowan, communication personnelle). Cette hypothèse est supportée par les résultats de spectrométrie de masse, les peptides obtenus couvrant la séquence des acides aminés 150 à 1093, et donnant une taille prédite de 105 kDa. De plus, l'évolution du signal montre que l'activité ne peut pas être seulement due à la forme de 100 kDa, car sa présence est très fortement diminuée à 48 h et 72 h de sporulation. Il faut également préciser que l'analyse en zymographie native n'est pas une technique quantitative.

L'ensemble de nos résultats suggère qu'*Et*-ApN1 et *Pf*A-M1 possèdent des fonctions similaires dans le développement parasitaire. Cependant, les techniques de « knock-out» (KO) ou d'ARN interférents ne sont pas disponibles chez *E. tenella* pour confirmer l'implication directe d'*Et*-ApN1 dans le développement parasitaire ; nous ne pouvons donc pas exclure que d'autres aminopeptidases soient également impliquées dans ce processus. Malgré le fait que nous n'ayons pas pu prouver qu'*Et*-ApN1 soit requis pour le développement d'*E. tenella*, les résultats présentés dans cette étude démontrent clairement la forte homologie entre *Et*-ApN1 et *Pf*A-M1. Récemment, la synthèse d'inhibiteurs dérivés de la bestatine a permis de montrer que l'unique inhibition de *Pf*A-M1 était suffisante pour abroger le développement parasitaire (Velmourougane, Harbut *et al.* 2011). La synthèse d'un inhibiteur spécifique d'*Et*-ApN1 pourrait être une technique alternative efficace pour étudier

les fonctions de cette aminopeptidase. La production de tels inhibiteurs est actuellement en cours.

Remerciements : Nous remercions Janene Bumstead, Damer Blake, Fiona Tomley (Royal Veterinary College, Londres) et Thomas Jeffers (University of Arkansas, USA) pour nous avoir fourni les souches Wis et Wis 96 d'*E. tenella*. Nous aimerions également remercier Marilyn Katrib, Phillipa A. Sharman, Robert A. Walker et Nicholas C. Smith (University of Technology, Sydney, Australia) pour nous avoir fourni les ARN de gamétocytes ainsi que l'équipe de Pierre Péry (INRA, Jouy-en-Josas) pour nous avoir fourni les anticorps de souris dirigés contre l'énolase d'*E. tenella*. Nous remercions Julia Chamot-Rooke, Pascal Lenormand et Jean-Claude Rouselle de la Plateforme Protéomique de l'Institut Pasteur de Paris, pour l'aide à l'identification en spectrométrie de masse. Le laboratoire du Pr. Marcin Drag est financé par « The State for Scientific Research Grant N N401 042838 » et la « Foundation for Polish Science » de Pologne.

Chapitre 2 : Identification d'une troisième aminopeptidase N d'*E. tenella* : *Et*-ApN3

a. Introduction

Les aminopeptidases N (ApN/CD13) sont des métallo-protéases de la famille M1 (Rawlings and Barrett 1993). Elles sont caractérisées par la présence de 2 domaines GAMEN et $HExxHx_{18}E$ (Rawlings and Barrett 1995). Cette famille de protéases est impliquée dans des processus de prolifération cellulaire chez l'homme (Lohn, Mueller *et al.* 2002). Une altération de l'expression de l'ApN humaine est associée à différentes pathologies telles que des cancers et de l'hypertension (Kehlen, Lendeckel *et al.* 2003; Fontijn, Duyndam *et al.* 2006; Danziger 2008). D'une manière intéressante des anticorps ou des inhibiteurs dirigés contre cette protéase permettent de traiter certaines de ces maladies (Schmitt, Voegelin *et al.* 2013).

Les aminopeptidases N sont très largement répandues et conservées au sein du règne du vivant. Elles ont été décrites chez de nombreux parasites et notamment chez *Plasmodium falciparum* (Florent, Derhy *et al.* 1998; Berthonneau, Rodier *et al.* 2000; Padda, Tsai *et al.* 2002). L'aminopeptidase N plasmodiale, *Pf*A-M1(Allary, Schrevel *et al.* 2002), est impliquée dans le développement et le métabolisme (Azimzadeh, Sow *et al.* 2010; Ragheb, Dalal *et al.* 2011). Des études ont démontré que *Pf*A-M1 est une cible thérapeutique dans la mesure où sa seule inhibition est suffisante pour abroger le développement parasitaire (Flipo, Beghyn *et al.* 2007; Harbut, Velmourougane *et al.* 2011). Dans le cadre de la recherche de traitements alternatifs contre la coccidiose, l'une des plus importantes maladies aviaires, nous avons caractérisé *Et*-ApN1, une aminopeptidase N du parasite apicomplexe *Eimeria tenella*. Au cours de cette étude, nous avons mis en exergue les très fortes homologies que présentaient *Et*-ApN1 et *Pf*A-M1. Ces homologies nous ont permis d'émettre l'hypothèse que, comme *Pf*A-M1, *Et*-ApN1 était impliquée dans le développement parasitaire. Par ailleurs, des analyses phylogénétiques ont montré qu'il existait 2 groupes de parasites au sein des apicomplexes: ceux avec plusieurs aminopeptidases N (*T. gondii*, *N. caninum* et *E. tenella*) et ceux avec une seule aminopeptidase N (*Cryptosporidium spp.* et *Plasmodium spp.*).

Les analyses de séquences ont révélé que le deuxième gène d'aminopeptidase N prédit dans le génome d'*E. tenella* (*Et*-ApN2), ne possédait aucun des 2 domaines GAMEN et $HExxHx_{18}E$, indiquant que celle-ci n'était probablement pas active (Ashmun, Shapiro *et al.* 1992; Luciani, Marie-Claire *et al.* 1998). En revanche, ces 2 domaines sont présents chez les 3 aminopeptidases N de *T. gondii* et les 2 de *N. caninum*. Au vue de la proximité phylogénétique entre *T. gondii*, *N. caninum* et *E. tenella*, il est probable que *E. tenella* possède une autre aminopeptidase N active. De plus une activité aminopeptidase est détectée dans les mérozoïtes, où *Et*-ApN1 n'est pas exprimée, suggérant la présence d'une autre

aminopeptidase neutre active (Fetterer, Miska *et al.* 2005). Nous avons donc émis l'hypothèse qu'une autre aminopeptidase N active pourrait exister chez le parasite *E. tenella*.

Nous avons donc réalisé de nouvelles analyses du génome d'*E. tenella* et identifié une nouvelle aminopeptidase N que nous avons nommée *Et*-ApN3. Les analyses de séquences nous ont permis d'observer que *Et*-ApN3 possède bien les domaines GAMEN et $HExxHx_{18}E$ et qu'elle présente de très fortes homologies avec *Tg*-ApN3 de *T. gondii*. Nous avons également révélé que cette protéase était active au cours de la sporulation mais également dans les mérozoïtes de deuxième génération, suggérant un rôle complémentaire d'*Et*-ApN1 et *Et*-ApN3.

b. Matériels et méthodes

Ethique

Les protocoles expérimentaux sont réalisés en accord avec la loi française (Décret 2001-464 29/05/01) concernant l'utilisation des animaux en laboratoire. Les méthodes de soin et d'euthanasie des animaux sont en accord avec le guide d'éthique national et approuvées par le comité d'éthique de la Région Centre (CL2007-36).

Obtention des parasites *Eimeria tenella* et culture cellulaire

Des groupes de poulets PA12, âgés de 4 à 6 semaines, sont infectés oralement avec 10^4 et 10^5 oocystes sporulés avec les souches d'*E. tenella* Wis et Wis 96, respectivement (Jeffers 1975). Les oocystes non sporulés sont récoltés à partir des caeca infectés 7 et 5 jours après inoculation des animaux avec les souches Wis et Wis 96, respectivement. Les oocystes non sporulés sont ensuite purifiés par un traitement à l'hypochlorite de sodium pour éliminer les bactéries suivis d'une étape de flottaison au sulfate de magnésium comme décrit précédemment (Shirley 1995). Pour effectuer la sporulation, les oocystes sont suspendus dans de l'eau contenant 2 % de dichromate de potassium et incubés pendant 72 h à 26°C. Les sporozoïtes sont obtenus à partir d'oocystes fraichement sporulés. Les parois des oocystes sont broyées mécaniquement à l'aide de billes de verre de 0,5 mm et les sporocystes récupérés sont incubés dans du milieu d'excystation (trypsine 0,25 % (Sigma, USA), sels biliaires 0,5 % (VWR, USA) dans du PBS pH 7,5) à 41°C pendant une heure. Les sporozoïtes sont ensuite purifiés par une filtration en 2 étapes, la première sur du coton et la seconde sur un filtre de polycarbonate de 5 µM (Whatman, USA). Les mérozoïtes de 2ème génération (M2) sont obtenus comme décrit précédemment (Lal, Bromley *et al.* 2009). Les cellules MDBK sont maintenues en continu en culture dans du milieu HAM's F12 contenant 10 % de SVF, 2 mM de glutamine, 10 U/mL pénicilline et 10 µg/mL streptomycine comme décrit précédemment (Rieux, Gras *et al.* 2012).

Tests de l'activité enzymatique

Les lysats d'oocystes sont obtenus par destruction mécanique des oocystes avec des billes de verre de 0,5 mm dans du tampon PBS 10 mM pH 7,4. Les lysats sont ensuite soumis à 2 cycles de sonication de 30 s comprenant 5 s d'impulsion d'amplitude 40 (Bioblock scientific, Vibracell 75455, Fisher, USA). Après centrifugation (15 000 g, 30 min, 4°C), les surnageants sont prélevés et la concentration protéique est déterminée par la méthode de BCA (Smith,

Krohn *et al.* 1985). Les lysats sont dilués à une concentration finale de 1 mg/mL et stockés à -80°C. Pour mesurer l'activité enzymatique, 40 µg de lysat d'oocystes sont incubés dans du tampon de réaction (10 mM phosphate buffer pH 7,4 ; 70 mM NaCl) avec un substrat fluorescent, le H-Ala-AMC (Genecust, Luxembourg), à une concentration finale de 20 µM. L'activité enzymatique est enregistrée (λ excitation = 350 nm et λ émission = 450 nm) pendant 2 min à l'aide d'un spectrofluorimètre (Photon Technology International, USA). Chaque test est réalisé en triplicata. L'activité aminopeptidase correspond à la moyenne des réplicats ± l'écart-types. Pour les tests d'inhibition de l'activité enzymatique, le lysat de M2 est pré-incubé pendant 10 min avec l'amastatine à 100 µM puis le substrat, H-Ala-AMC, est ajouté. L'activité résiduelle est enregistrée comme décrit ci-dessus.

Zymographie native

Les échantillons sont repris dans du tampon de charge natif puis les protéines sont séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide avec une réticulation de 8 % contenant 200 µM d'H-Ala-AMC (6 h, 100 V) à température ambiante. Pour permettre la réaction enzymatique, le gel est incubé dans du tampon de réaction à 37°C pendant 10 min. L'activité enzymatique est révélée sous UV avec un appareil Biot-Capt Xpress (Vilber Lourmat, France).

Détection d'une troisième aminopeptidase

La détection d'une aminopeptidase N supplémentaire a été réalisée par comparaison de séquences en utilisant les logiciels Blast et Multalign et la banque de donnée génomique d'*E. tenella* (Corpet 1988; Reid, Blake *et al.* 2010). La séquence en acides aminés d'*Et*-ApN1 (KF602061) a été comparée au génome par un Blastp. Les résultats avec des probabilités significatives ont ensuite été comparés avec *Et*-ApN1 grâce au logiciel Multalin. Les amorces ont été définies à partir de la séquence théorique des 3 contigs détectés ETH_00038820, ETH_00043935 et ETH_00033545 (ETH_00038820: For1, 5'-CAGCAGCAGCGA-ACGAAAGCTTC-3' ; ETH_00043935: For2, 5'-GTTTAGAGACCAACTCT-TTTC-3' et For2-3, 5'-CAGCCAAC-GAAGTTGCCTTTAG-3' et ETH_00033545: Rev2-3 5'-CTGCT-GCATGTCTGCGAGGAC-3'). Les conditions pour la PCR étaient 95°C 1 min, 55°C 30 s et 72°C 1 min pendant 30 cycles avec de la GoTaq® ADN polymérase (Promega, USA). Le produit d'amplification est visualisé par migration sur gel d'agarose 1 %, contenant 0,5 µg/mL de bromure d'éthidium.

Fractionnement des protéines d'oocystes et identification des protéases par spectrométrie de masse

Un lysat d'oocystes (5 x 10^8) est obtenu par broyage avec des billes de verre puis sonication comme décrit précédemment. Après centrifugation pendant 30 min à 15 000 g à 4°C, le surnageant a été prélevé (volume final 10 mL) et soumis à une isoélectrofocalisation en veine liquide (Cellule Rotofor de 60mL, Bio-Rad Laboratories, USA). Le volume de l'échantillon a été complété à 50 mL avec de l'eau et des ampholytes (BioLyte, gamme de pH= 3 – 10, Bio-Rad, USA) ont été ajoutés à 2,5 % (w/v). L'échantillon a été chargé dans le Rotofor et la focalisation isoélectrique a été réalisée à une puissance constante de 12 W pendant 5 h à 4°C. Les vingt fractions ont été immédiatement collectées, leur pH a été déterminé et l'activité enzymatique vis-à-vis du H-Ala-AMC analysée (20 µM final, λ_{ex} = 350 nm, λ_{em} = 450 nm). Les fractions positives ont été regroupées et concentrées à un volume final de 1 mL et ce concentrat a été injecté dans une colonne de chromatographie d'exclusion par la taille (TSK G4000PW 600 x 7.5 mm HPLC column,Tosohaas, Cluzeau Info Labo, France), équilibrée avec un tampon de 150 mM phosphate de sodium, pH 7,4 et un Äktapurifier 10 (GE Healthcare, Orsay, France). La chromatographie a été réalisée à un débit de 0,5 mL/min et suivie par détection UV à 214 et 280 nm. Quarante fractions de 0,5 mL ont été recueillies et les fractions actives ont été regroupées et concentrées dans un volume final de 1 mL. Cet échantillon a été déposé sur un gel de polyacrylamide non dénaturant avec une réticulation de 8 % contenant 200 µM d'H-Ala-AMC pour une étude en zymographie native. Après migration (100 V, 6 h) à température ambiante dans des conditions non dénaturantes, le gel a été incubé dans du tampon de réaction comme décrit ci-dessus. La bande d'intérêt a été excisée et envoyée à la plateforme de spectrométrie de masse de l'Institut Pasteur de Paris pour l'identification des protéases par MS-MS.

Extraction d'ARN et RT-PCR

Des oocystes (5×10^7) sont prélevés à différents temps après le début de la sporulation (0, 12 et 72 h) et broyés comme décrit précédemment. Les ARN de chaque lysat ainsi que de 2 autres stades parasitaires, des mérozoïtes 2ème génération (10^7) et des gamétocytes (10^6), sont extraits avec 1 mL de guanidinium thiocyanate-phénol-chloroforme (TRIzol®, .Invitrogen, USA) selon le protocole fourni par le fabricant. Les ARN totaux sont suspendus dans l'eau traitée au diéthyl pyrocarbonate (DEPC) à une concentration finale de 1 mg/ml. Des aliquots de 1 µg d'ARN totaux sont utilisés pour une rétro transcription des ARNm en

utilisant des amorces Poly dT et une transcriptase réverse de type II (Invitrogen, USA). Dans le but d'étudier le profil de transcription d'*Et*-ApN1, *Et*-ApN2 et *Et*-ApN3 des fragments d'ADNc sont amplifiés en utilisant les amorces spécifiques d'*Et*-ApN1 (For 5'-GTTT-TATAGCAATCTTATAGTCTTC-3' et Rev 5'-CGACCCGCAACGAGGAGCATACGC-3'); d'*Et*-ApN2 (For 5'-GGCCGCCACTTCGCCATTTTC-3' et Rev 5'-GATGAGCTACTT-TGGCACC-3'), et d'*Et*-ApN3 (For 5'-CAGCAGCAGCGAACGAAAG-CTTC-3' et Rev 5'-GTAACAGGGTTTCCTAAAAGG-3'). L'actine (For 5'- ATCTTCATCGTAGACGGAG-CCAG-3' et Rev 5'-GTGTGTCCCACAC-TGTTCCTATC-3') est utilisée comme gène de ménage. Les conditions pour la PCR sont : 95°C 1 min, 55°C 30 s et 72°C 1 min pendant 30 cycles avec de la GoTaq DNA polymérase (Promega, USA). Le produit d'amplification est visualisé par migration sur gel d'agarose 1 %, contenant 0,5 µg/mL de bromure d'éthidium.

Séquençage d'*Et*-ApN3

La séquence disponible d'*Et*-ApN3 est amplifiée à partir d'ADNc d'oocystes non sporulés avec les amorces ApN3For (5'-CAGCAGCAGCGAACGAAAGCTTC-3') et ApN3Rev (5'-CTGCTGCATGTCTGCGAGGAC-3') déterminées à partir des séquences prédites d'*Et*-ApN3 (ETH_00038820 et ETH_00033545, respectivement). *Et*-ApN3 est amplifiée en utilisant la Phusion High Fidelity DNA polymérase (New England Biolabs, USA). Les conditions d'amplification sont 95°C 1 min, 55°C 30 s, 72°C 2 min pendant 30 cycles. Le produit d'amplification est visualisé par migration sur gel d'agarose 1 %. Le fragment d'intérêt est excisé du gel et purifié avec le kit Nucleospin® (Macherey Nagel, Allemagne). Pour permettre la ligation dans le vecteur, une adénine est ajoutée aux extrémités (72°C pendant 20 min, 10 µM dATP et 5 u de GoTaq DNA polymérase (Promega, USA). Puis le fragment est inséré dans un vecteur *pGEM*® (Promega, USA) afin de le séquencer.

Alignement de séquences

L'alignement de la séquence en acides aminés des *Et*-ApN et de plusieurs membres de la famille métallo-protéase M1 d'autres parasites a été réalisé avec le programme Cobalt (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/cobalt.cgi?link_loc=BlastHomeLink) en utilisant les numéros d'accessions suivants : *E. tenella Et*-ApN1 (KF602061), *P. falciparum Pf*A-M1 (Y09081), *E. coli* ApN (NP_415452.1), *S. cerevisiae* Ala/Arg aminopeptidase (NP_011913.1) and *H. sapiens* ApN (NP_001141.2). Le pourcentage d'identité en acides aminés dans la région $HExxHx_{18}E$, entre une séquence donnée et *Et*-ApN3, est également obtenu par l'utilisation de l'outil d'alignement multiple de Cobalt.

Expression de la protéine recombinante *Et*-ApN3$_r$

Un fragment d'ADN de 2 kb, représentant l'ensemble de la séquence identifiée et codant pour une forme tronquée *Et*-ApN3 de 81 kDa, a été amplifié à partir d'ADNc d'oocystes non sporulés avec les amorces ApN3ForBgl2 (5'-GGGAGATCTAACTTGAAACTCTCGG-GACTTTACTTGACCAATG-3') et ApN3RevEcoR1 (5'-GGAAAGACGGCAAGGGTTAC-CAGATCATTTGAGAATTCGGG-3') en utilisant la Phusion Hight Fidelity DNA polymerase (New England Biolabs, USA) comme décrit ci-dessus. Le vecteur d'expression pBad-6xHis-*Et*-ApN3 a été obtenu par ligation de l'insert dans le plasmide pBad His B (Invitrogen, USA), grâce aux sites de restriction *Bgl II* et *EcoR I* (New England Biolabs, USA). Des bactéries *E. coli* Top10 (Invitrogen, USA) ont été transformées avec le vecteur d'expression. Ces bactéries sont mises en culture dans du bouillon LB (Sigma, USA) à 37°C avec 0,02 % de L-arabinose pendant 4 h pour permettre l'expression de la protéine recombinante (*Et*-ApN3$_r$). La protéine *Et*-ApN3$_r$ est purifiée en condition dénaturante suivant le protocole de « batch » du kit Protino® Ni-NTA agarose (Macherey-Nagel, Germany). Brièvement, les cultures bactériennes ont été centrifugées (6000 g, 10 min, 4°C). Les culots ont été suspendus en NPI10 et les bactéries ont été lysées par 5 cycles de sonication de 30 s comprenant 5 s d'impulsion à une amplitude de 40. Après centrifugation (10 000 g, 30 min 4°C), les corps d'inclusion contenus dans le culot sont prélevés et dissociés dans du tampon DNPI10 contenant 8 M d'urée pendant 1 h. Après centrifugation (10 000 g, 30 min 4°C), le surnageant est récolté et incubé avec 1 mL de billes Ni-NTA pendant 1 h à température ambiante sous agitation (20 tours.min^{-1}). Après lavage des billes dans du tampon DNPI20, *Et*-ApN3r est éluée dans 2 mL de tampon DNPI250 et dialysée pendant une nuit. L'*Et*-ApN3$_r$ purifiée est stockée à 4°C avant migration sur un gel d'acrylamide 8%. Après une coloration au bleu de coomassie, *Et*-ApN3$_r$ est excisée du gel et broyée mécaniquement avec un pilon en verre. Les échantillons d'acrylamide broyés sont stockés à -20°C.

Obtention des anticorps anti-*Et*-ApN3

Des souris sont immunisées avec 200 µL d'*Et*-ApN3 dans de l'acrylamide broyé et stimulées 6 fois à 2 semaines d'intervalle avec 400 µL d'*Et*-ApN3$_r$. Le sérum total des souris (Sα-*Et*-ApN3) est obtenu par centrifugation à 850 g pendant 15 min à température ambiante. La spécificité des anticorps est évaluée par western blot avec la protéine recombinante et des lysats d'*E. tenella.*

Western blot

Les échantillons sont préparés avec un tampon Laemmli contenant 2 % v/v de β-mercapthoéthanol. Les échantillons sont ensuite chauffés pendant 5 min à 95°C. Les protéines sont séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide d'une réticulation de 8 %, puis transférées sur une membrane de nitrocellulose (Hybond ECL, GE Healthcare, USA). La membrane est saturée avec du lait écrémé 5% et incubée avec les anticorps primaires Sα-*Et*-ApN3$_r$ (1:500). Des anticorps de chèvre anti-Lapin couplés à la peroxydase sont utilisés comme anticorps secondaires (1:5000, Sigma, USA). L'immunodétection est réalisée en utilisant le kit SuperSignal^{TM} West Pico chemiluminescent susbtrates en suivant les recommandations du fournisseur (Pierce, ThermoFisher Scientific, USA). La membrane est ensuite révélée avec un ChemiSmart5000 (Vilber Lourmat, France).

Immuno-localisation d'*Et*-ApN3

Des cellules MDBK (2 x 10^5) (Madin-Darby bovine kidney) sont infectées avec des sporozoïtes (2 x 10^5) dans des plaques 24 puits pendant des temps variables (4 à 120 h) à 41°C et 5 % de CO_2. Pour les mérozoïtes de 2ème génération (M2) et les gamètes, les sporozoïtes sont incubés avec une culture primaire de cellules de reins de poulets (PCKC) comme décrit précédemment (Hofmann and Raether 1990). Les cellules sont infectées soit avec la souche sauvage *E. tenella* Wis (pour les étapes précoces d'invasion et les M2) soit la souche précoce *E. tenella* Wis 96, qui ne possède qu'une génération de mérozoïtes et permet une formation plus rapide des gamètes (96 h au lieu de 135 h avec la souche Wis). Les cellules infectées sont lavées et fixées au PAF 2,7 %. Après perméabilisation avec 0,1 % Triton X-100, les parasites intracellulaires sont marqués en utilisant les anticorps Sα-*Et*-ApN3$_r$ (1:500) avec un anticorps Lα-Mic-4 ou Lα-GAM56 (1:1000, Mic-5 est un marqueur des micronèmes du pôle apical d'*E. tenella* dans les étapes précoces de l'invasion et GAM56 est un marqueur des macrogamètes). Les anticorps primaires sont révélés avec des anticorps α-lapin couplés à l'Alexa 488 (1:1000, Invitrogen, USA) et des anticorps α-souris couplés à l'Alexa 594 (1:1000, Invitrogen, USA). Les lamelles sont mises en contact avec du Vectashield contenant 1,5 µg/mL de DAPI (Clinisciences, France). Les cellules sont ensuite observées au microscope à fluorescence (Zeiss Axiovert 200 microscope, Carl Zeiss, Allemagne).

c. Résultats

Détection d'une activité aminopeptidase dans les mérozoïtes 2ème génération d'*E. tenella*

Dans le but de confirmer que des aminopeptidases neutres étaient présentes dans les stades multiplicatifs asexués, les mérozoïtes, nous avons réalisé des tests biochimiques sur des lysats de mérozoïtes de 2ème génération (M2) et les avons comparés à des lysats d'oocystes pris à 0, 6, 12, 24, 48 et 72 h après l'initiation de la sporulation. Pour enregistrer l'activité enzymatique, les lysats ont été incubés en présence d'un substrat spécifique des aminopeptidases, l'H-Ala-AMC. Une activité aminopeptidase est détectée dans les M2 mais avec un delta d'unité de fluorescence 2 fois plus faible que celui enregistrée dans les oocystes (Figure 36A). La pré-incubation du lysat de M2 avec l'inhibiteur spécifique de métallo-protéases, l'amastatine (10 µM), inhibe significativement ($p < 0,001$) l'activité enregistrée (Figure 36B). L'ensemble de ces données suggèrent qu'une ou plusieurs aminopeptidases neutres sont actives au stade M2 d'*E. tenella*.

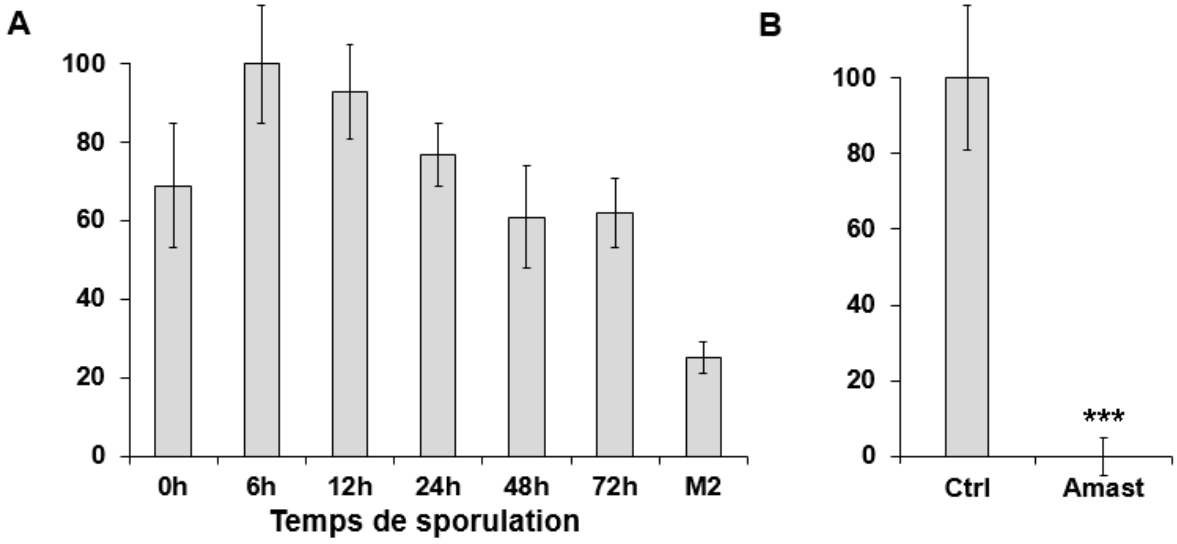


Figure 36 : Enregistrement d'une activité aminopeptidase dans un lysat de M2

A, Profil d'activité aminopeptidase contre l'H-Ala-AMC de lysats d'oocystes en cours de sporulation et de stade M2. L'activité aminopeptidase a été évaluée sur des lysats pris à différents temps de sporulation. *B*, Effets de l'amastatine sur l'activité de type aminopeptidase des M2. L'effet de l'amastatine (Amast) a 10 µM, été évalué contre un lysat de M2 et comparé à un contrôle sans inhibiteur (Ctrl). Les valeurs reportées sont des moyennes de trois expériences indépendantes. La différence intergroupe (p value) entre les conditions avec et sans inhibiteur a été calculée par un test de Student apparié, la significativité est indiquée avec *** ($p < 0,001$).

Identification d'une nouvelle aminopeptidase N d'*E. tenella*, *Et*-ApN3

Nous avions précédemment caractérisé *Et*-ApN1, une métallo-protéase présente pendant la sporulation mais non-observée dans des M2 par western blot et immuno-localisation. Pour visualiser le profil d'activité des aminopeptidases actives dans les M2 et les comparer à celles actives pendant la sporulation, nous avons réalisé un zymogramme natif. Des lysats d'oocystes et de M2 ont été chargés sur un gel d'acrylamide natif contenant du substrat H-Ala-AMC. D'une manière intéressante, la zymographie native nous avait permis de révéler 2 signaux, dont un que nous avions précédemment associé à *Et*-ApN1. Ce premier signal d'un poids moléculaire apparent de ~ 95 kDa, est présent pendant la sporulation et absent des M2 (Figure 37). Le deuxième signal, d'un poids moléculaire apparent de ~ 130 kDa, augmente graduellement au cours de la sporulation mais persiste dans les M2. Ces données suggèrent qu'une autre aminopeptidase capable d'hydrolyser l'H-Ala-AMC et sensible à l'amastatine est active pendant la sporulation et le stade M2 d'*E. tenella*.

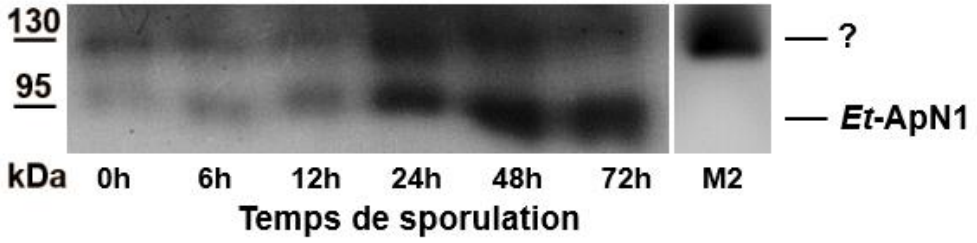


Figure 37 : Profil d'activité en zymographie native pendant la sporulation et dans les M2

Les protéines des lysats ont été séparées sur un gel natif d'acrylamide à 8% de réticulation contenant 200 µM d'H-Ala-AMC et observé sous lumière UV.

Pour déterminer si une autre aminopeptidase N, non annotée dans le génome, existait, nous avons réalisé un BLASTp de la séquence en acide aminé d'*Et*-ApN1 contre la base de données d'*E. tenella* dans Toxodb. Outre *Et*-ApN1 et *E*t-ApN2, 3 contigs sont détectés avec des probabilités (e-values) significatives (Figure 38). L'alignement des 3 séquences avec celle d'*Et*-ApN1 grâce au logicel Multalign révèle que ces contigs sont homologues à 3 parties distinctes d'*Et*-ApN1 (65, 49 et 51 % d'identité avec *Et*-ApN1 pour ETH_0004935, ETH_00033545 et ETH_38820, respetivement), suggérant que ces 3 fragments pourraient appartenir à un seul et même gène (Figure 38). Pour vérifier cette hypothèse, plusieurs amorces ont été déterminées à partir des séquences prédites et les analyses par PCR ont révélé que les 3 fragments appartenaient bien à un seul et même gène (Figures 38B et C). Nous avons nommé cette nouvelle protéase : *Et*-ApN3.

A

Numéro d'accession	Nom	Identité (%)	Probabilité (E-value)
ETH_00013105	Et-ApN1	100	0.
ETH_00015595	Et-ApN2	43	6.2e-186
ETH_00043935	Non identifié	65	7.9e-68
ETH_00033545	Non identifié	49	4.0e-49
ETH_00038820	Non identifié	51	1.5e-46

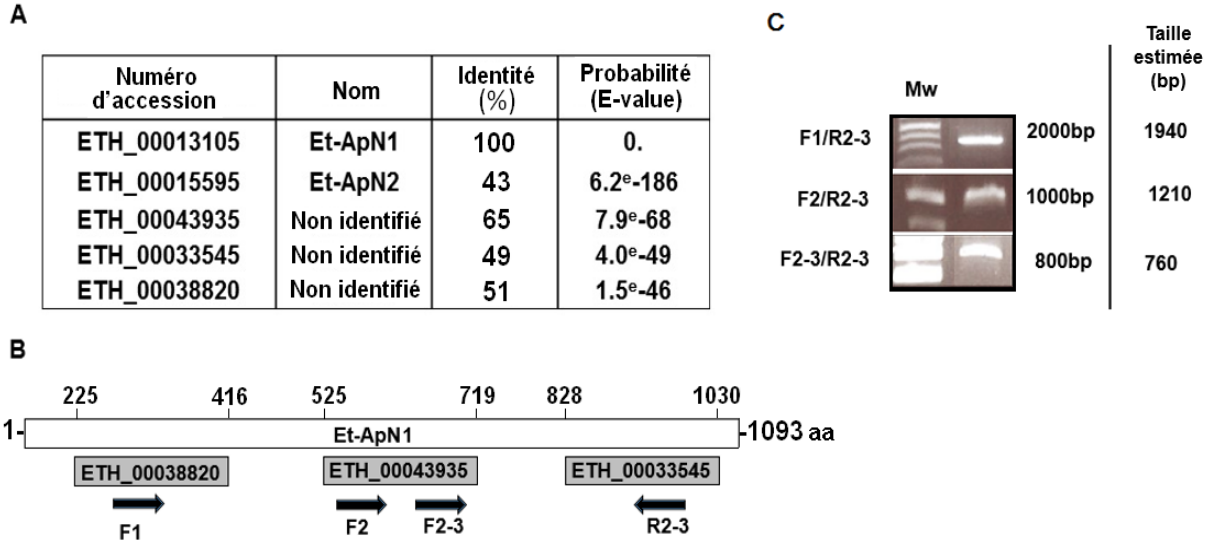


Figure 38 : Détection d'une troisième aminopeptidase N dans le génome d'*E. tenella*

A, Résultat du BLASTp de la séquence d'*Et*-ApN1 contre le génome d'*E. tenella*. Le pourcentage d'identité est calculé sur l'ensemble des séquences homologues. *B*, Représentation schématique de la disposition des 3 contigs sur *Et*-ApN1. Les trois contigs non identifiés ont été replacés à leur position respective par rapport à *Et*-ApN1. Les bornes en acides aminés avec lesquelles ces contigs sont homologues sont indiquées au dessus d'*Et*-ApN1. La position approximative des différentes amorces utilisées est également renseignée. *C*, Résultats des PCR avec les amorces des différents contigs. Les produits d'amplification sont déposés en gel d'agarose 1 % contenant du bromure d'ethidium et sont observés sous lumière UV.

Alignements de la séquence protéique d'*Et*-ApN3 avec les membres de la famille des métallo-protéases M1

Pour déterminer l'homologie d'*Et*-ApN3 avec d'autres membres de la famille des métallo-protéases M1, un alignement des séquences en acides aminés a été généré. Nous avons utilisé la nouvelle séquence d'*Et*-ApN3, celles d'*Et*-ApN1 et *Et*-ApN2 et des aminopeptidases N de *T. gondii* et de *N. canimun* et les séquences des métallo-protéases M1 de *P. falciparum*, de *C. parvum* et des aminopeptidases N d'*E. coli*, de *S. cerevisiae* et de *H. sapiens.* Bien que la séquence d'*Et*-ApN3 soit incomplète, on retrouve la conservation des 2 motifs indispensables pour l'activité : le motif $HExxHx_{18}E$ et le motif GAMEN. Le motif $HExxHx_{18}E$ est localisé entre les positions 289 et 313 et le motif GAMEN entre les positions 253 et 258 (Figure 39).

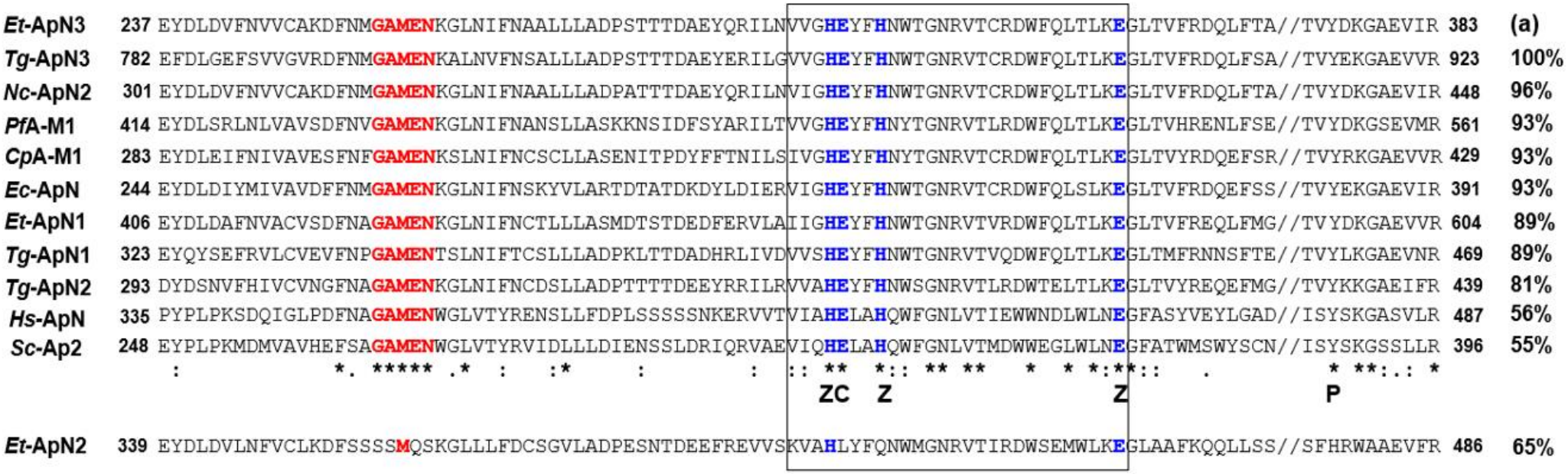


Figure 39 : Comparaison d'*Et*-ApN3 avec d'autres aminopeptidases N

Alignement multiple de la séquence du site actif (région encadrée) et des acides aminés flanquant avec *Et*-ApN3 des membres de la famille *Et*-ApN (*Et*-ApN1 KF602061, et *Et*-ApN2 ETH_00015595), et quelques membres sélectionnés de la famille M1 zinc-métallo-protéase (*P. falciparum Pf*A-M1 XP_001349846.1, *E. coli* ApN, NP_415452.1; *S. cerevisiae* Ala/Arg aminopeptidase NP_011913.1; *H. sapiens* ApN, NP_001141.2). Les acides aminés identiques (*) et conservés (.) entre toutes les séquences sont indiquées. Les positions des sites de liaison au zinc (Z), du résidu glutamate requis pour l'activité catalytique (C) et du donneur de proton (P) sont indiquées en gras. Le pourcentage d'identité entre les acides aminés d'une séquence donnée et *Et*-ApN3, dans la région encadrée, est indiqué en (a). Les motifs GAMEN et HExxHx_{18}E sont en rouge et en bleu, respectivement.

La présence des motifs GAMEN et HExxHx_{18}E corrobore le fait que, comme *T. gondii* et *N. caninum*, *E. tenella* possède plusieurs aminopeptidases N actives par opposition à *Plasmodium spp.* et *Cryptosporidium spp.*. L'alignement avec les autres aminopeptidases N a révélé qu'*Et*-ApN3 possède une homologie plus importante au niveau du site actif (région encadrée) avec les aminopeptidases de *T. gondii*, *N. caninum*, *P. falciparum* et *C. parvum* qu'avec *Et*-ApN1 (100, 96, 93 et 93 % contre 89 %, respectivement). Les homologies de séquences entre *Et*-ApN3 et *Pf*A-M1 sont également plus importantes qu'elles ne le sont entre *Et*-ApN1 et *Pf*A-M1 (93 % et 85 %, respectivement).

Profil d'expression et localisation d'*Et*-ApN3 au cours du cycle biologique d'*E. tenella*

Le profil de transcription a été déterminé par RT-PCR sur des ARN totaux d'oocystes à 3 temps différents de sporulation : non sporulés (0 h), partiellement sporulés (12 h), totalement sporulés (72 h), ainsi que des mérozoïtes de 2ème génération (M2) et des gamètes (Choy, Bryant *et al.*). Le profil d'*Et*-ApN3 a été comparé à celui d'*Et*-ApN1 (Figure 40A).

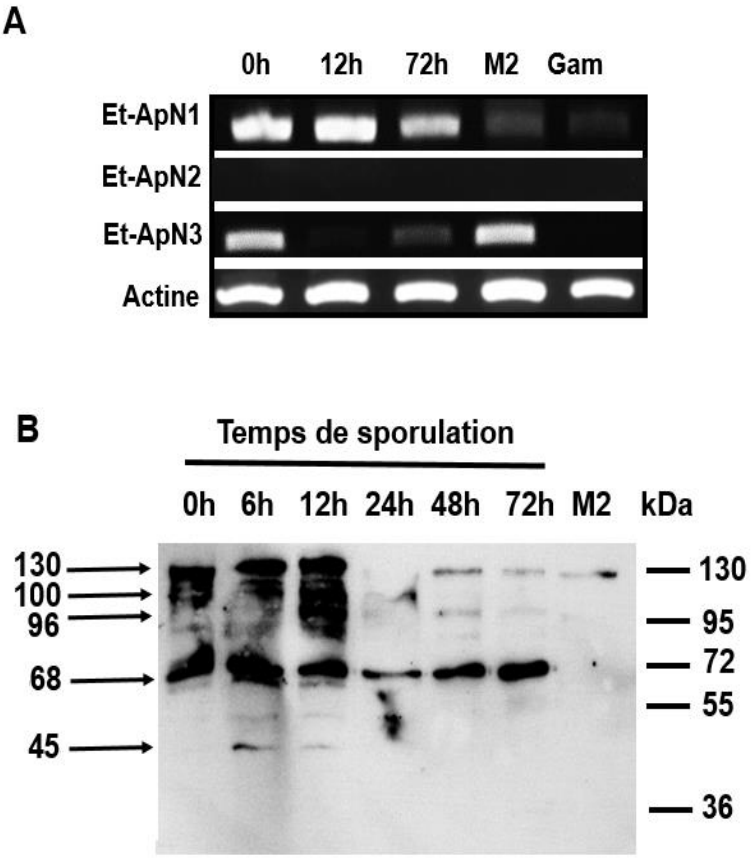


Figure 40 : Profil de transcription et expression d'*Et*-ApN3

A, Profil de transcription des aminopeptidases N1 et N3 d'*E. tenella* pendant le cycle biologique. La RT-PCR a été réalisée avec des ARNs d'oocystes prélevés à différents temps de sporulation; non sporulés (0 h); partiellement sporulés (12 h) et sporulés (72 h); de mérozoïtes (M2) et de gamètes (Choy, Bryant *et al.*). L'actine sert de contrôle interne. *B*, Détection d'*Et*-ApN3 dans les M2. Des lysats d'oocystes prélevés à différents temps de sporulation (0, 6, 12, 24, 48, and 72 h) et de mérozoïtes (M2) ont été marqués par immuno-blotting avec des anticorps Mα-*Et*-ApN3$_r$.

Contrairement à *Et*-ApN1, qui est exprimée tout au long du cycle biologique d'*E. tenella*, *Et*-ApN3 semble spécifiquement transcrite dans les stades oocystes non sporulés et M2. Un léger signal est également détecté au stade oocyste sporulé. En utilisant la protéine recombinante, nous avons produit des anticorps polyclonaux Mα-*Et*-ApN3$_r$ pour analyser par western blot le profil d'*Et*-ApN3 à 6 temps de sporulation (0, 6, 12, 24, 48, et 72 h) et dans les M2 (Figure 40B). Par western blot, nous observons jusqu'à 5 formes d'*Et*-ApN3 (130, 100, 96, 68 et 45 kDa) au cours de la sporulation. Les formes de 130 et 68 kDa sont les formes majoritaires. Ce profil général de clivage d'*Et*-ApN3 est très similaire à celui d'*Et*-ApN1 (130, 100, 96, 68 et 38 kDa). *Et*-ApN3 semble majoritairement présente pendant les douze premières heures de la sporulation. Au-delà de ces 12 h, seules les formes de 130 et 68 kDa persistent jusqu'à la fin de la sporulation. *Et*-ApN3 est également détectée dans les M2 (forme de 130 kDa).

Pour confirmer la présence d'*Et*-ApN3 dans la partie intracellulaire du cycle biologique d*'E. tenella*, nous avons localisé *Et*-ApN3 pendant le développement intracellulaire du parasite (Figure 41). Des cellules MDBK et PCKC ont été infectées avec des parasites et fixées à différents temps. Les MDBK et des sporozoïtes de la souche Wis ont été utilisés pour les premières étapes du développement. Les cellules PCKC ont été utilisées pour la production de mérozoïtes de 2ème génération car les mérozoïtes de 1ère génération ne sont pas capables d'envahir les cellules MDBK. Comme les cultures primaires ont une durée de vie très limitée, nous avons utilisé des sporozoïtes de la souche Wis96 pour obtenir une formation plus rapide des gamètes. Des tests d'immunofluorescence indirecte ont été réalisés avec les anticorps polyclonaux Mα-*Et*-ApN3$_r$ (Figure 41). Des anticorps Lα-*Et*-Mic5$_r$ et Lα-GAM56$_r$ ont été utilisés comme contrôle. Les anticorps Lα-*Et*-Mic5$_r$, marquent le pôle apical du parasite dans les stades précoces du développement parasitaire (inférieurs à 4 h p.i.) (Brown, Billington *et al.* 2000). Les anticorps Lα-GAM56$_r$ marquent les macrogamètes (Belli, Ferguson *et al.* 2009). De 4 à 16 h, *Et*-ApN3 est majoritairement détectée au niveau du pôle apical du parasite, suggérant qu'elle est potentiellement sécrétée ou impliquée dans la maturation des protéines sécrétées. À 24 h, le signal d'*Et*-ApN3 est diffus dans tout le parasite. *Et*-ApN3 est détectée dans les mérozoïtes de 2ème génération. Ces résultats sont en corrélation avec ceux du western blot et du profil de transcription. *Et*-ApN3 n'est pas détectée dans les macro et microgamètes, ce qui est cohérent avec le profil de transcription.

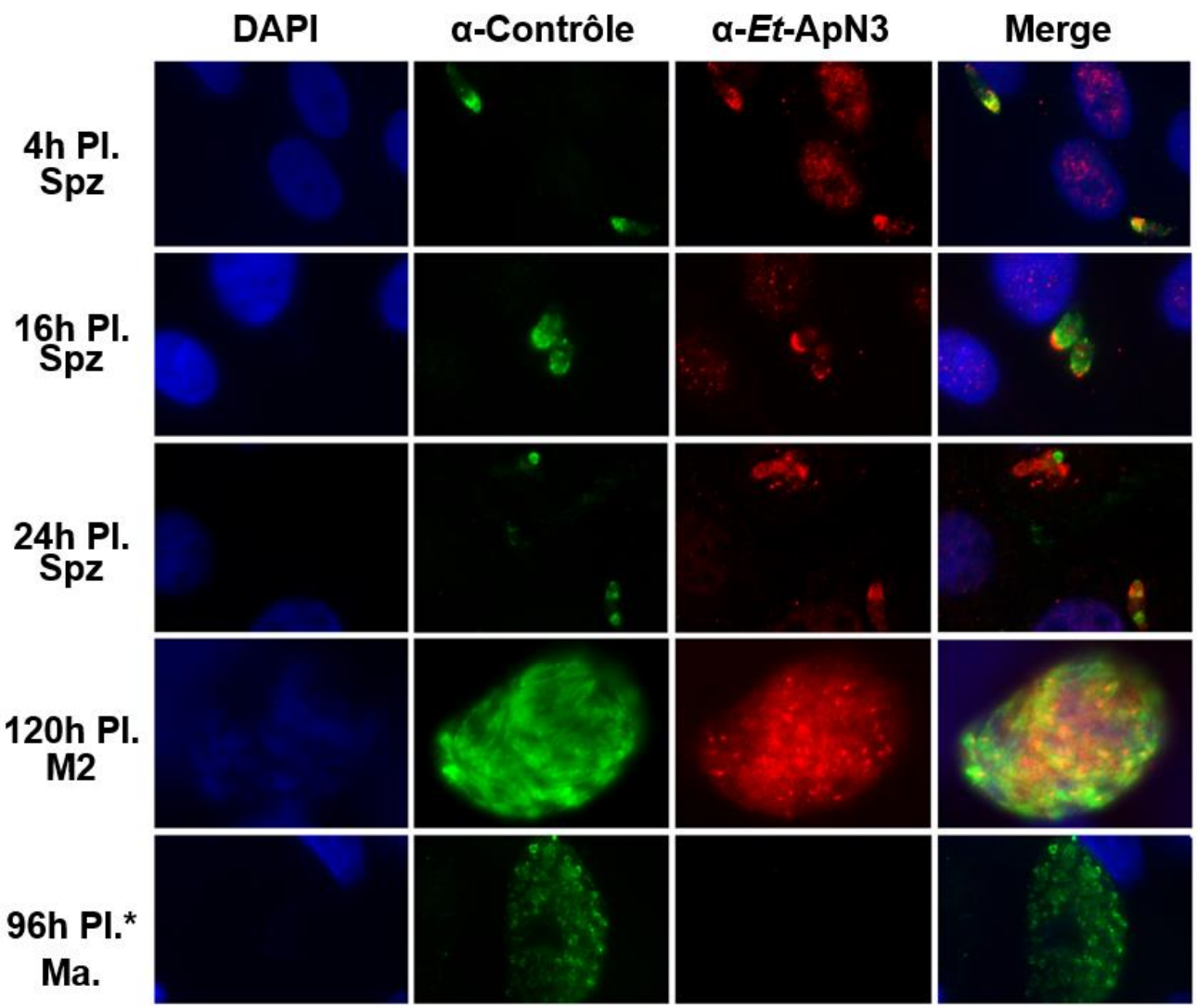


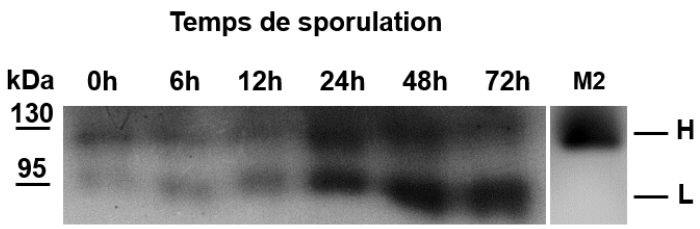
Figure 41 : Localisation d'*Et*-ApN3 au pôle apical du parasite pendant les phases précoces du développement et dans les M2

Des cellules MDBK ou PCKC ont été infectées avec les souches *E. tenella* Wis ou Wis 96 (*) respectivement, et ont été fixées avec 2,7 % PAF. Les expérimentations de développement précoce (4, 16, et 24 h) ont été réalisées avec des MDBK infectées avec des sporozoïtes de la souche Wis. Les mérozoïtes (M2) ont été obtenus en infectant des PCKC par des sporozoïtes de la souche Wis. Les gamètes ont été obtenus en infectant des PCKC par des sporozoïtes de la souche Wis96 (Ma : Macrogamète, Mi : Microgamète). Les parasites ont été doublement marqués avec des anticorps Lα-Mic5$_r$ (Spz et M2, marquage des micronèmes du pôle apical) ou Lα-GAM56$_r$ (Ma., marquage macrogamètes) et Mα-*Et*-ApN3$_r$; le noyau des cellules a été marqué au DAPI.

Réattribution des signaux détectés en zymographie native

Afin de déterminer si *Et*-ApN3 était active, nous avons analysé de manière indépendante, par spectrométrie de masse, les signaux détectés en zymographie native (Figure 42A). Cette analyse a identifié *Et*-ApN3 comme la protéase responsable du signal détecté à ~ 130 kDa, présent pendant la sporulation et dans les M2. Les 40 peptides obtenus par la spectrométrie de masse couvrent 71 % de la séquence d'*Et*-ApN3 (Figure 42B).

A



B

Identification	Nombre de hit	Couverture (%)
Et-ApN3	40	71,33*
Et-ApN1	15	20,40
Enoyl réductase	4	16,90
HSP 70	7	13,50
Enolase	2	7,74

C

Identification	Nombre de hit	Couverture (%)
Et-ApN1	48	56,90
Et-ApN3	16	39,90*
HSP 70	10	15,40
Enolase	2	7,74

Figure 42 : Détection d'une forme active d'*Et*-ApN3

A, Profil d'activité au cours de la sporulation en zymographie native. Les protéines des lysats ont été séparées sur un gel natif d'acrylamide contenant 200 µM d'H-Ala-AMC et observé sous lumière UV. Deux signaux (H et L) sont observés. *B*, Identification de la protéase active responsable du signal (H) C, Identification de la protéase active responsable du signal (L). Les analyses ont été effectuées après le fractionnement des protéines d'un lysat d'oocystes non sporulés et utilisation des séquences d'*Et*-ApN1 et d'*Et*-ApN3. Les "Hits" sont les fragments de spectrométrie de masse avec une homologie de 100 % avec la séquence de référence. "Couverture" est le % d'homologie entre l'ensemble des hits identifiés et les séquences complètes d'*Et*-ApN1 et d'*Et*-ApN3. * % couverture relative à la séquence connue d'Et-ApN3

L'analyse a également confirmé que le signal ~ 95 kDa, présent pendant la sporulation et absent des M2, est dû à *Et*-ApN1 avec 48 peptides couvrant 57 % de la séquence totale d'*Et*-ApN1 (Figure 42C). L'ensemble de ces données confirme qu'*Et*-ApN3 est active pendant la sporulation et dans les M2 et qu'*E. tenella* possède bien plusieurs aminopeptidases N actives. Ces données suggèrent qu'*Et*-ApN3 pourrait avoir des fonctions complémentaires de celle d'*Et*-ApN1, et notamment un rôle important dans le stade M2.

d. Discussion et conclusion

Nos études précédentes ont permis de caractériser *Et*-ApN1, l'une des 2 aminopeptidases N décrites dans le génome d'*E. tenella* (*Et*-ApN1 et *Et*-ApN2). Nous avons montré que seule *Et*-ApN1 était active et que *Et*-ApN2 n'était pas ou faiblement transcrite et ne possédait pas les 2 domaines, GAMEN et HExxHx_{18}E, indispensables à l'activité de la protéase (Ashmun, Shapiro *et al.* 1992; Luciani, Marie-Claire *et al.* 1998). L'ensemble de ces travaux est en corrélation avec ceux obtenus par (Fetterer, Miska *et al.* 2005) sur l'activité aminopeptidase détectée au cours de la sporulation. Cependant, (Fetterer, Miska *et al.* 2005)ont également mis en évidence une activité aminopeptidase dans un lysat de mérozoïtes. Lors de nos travaux, nous avons montré par western blot et immuno-localisation, qu'*Et*-ApN1 n'était pas présente dans les mérozoïtes, ce qui signifierait qu'elle n'est pas responsable de l'activité détectée par Fetterer *et al*.

Dans le but de clarifier cette différence, nous avons réalisé des tests d'activité sur des lysats de mérozoïtes et, comme décrit par (Fetterer, Miska *et al.* 2005), nous avons observé une activité de type aminopeptidase neutre dans le lysat de mérozoïtes en utilisant le substrat H-Ala-AMC. Cette activité est sensible à l'ajout de l'inhibiteur d'aminopeptidases, l'amastatine. Nous avons donc émis 2 hypothèses :

- Une autre aminopeptidase N active existe chez *E. tenella*. Cette hypothèse est soutenue par la présence de 3 aminopeptidases N chez *T. gondii* et l'expression de la forme active de *Pf*A-M1 dans les mérozoïtes de *P. falciparum* (Allary, Schrevel *et al.* 2002).

- Une autre aminopeptidase neutre, une leucyl-aminopeptidase (famille M17), est responsable de l'activité aminopeptidase détectée dans les mérozoïtes. Cette hypothèse est soutenue par la transcription de la leucyl-aminopeptidase au stade M2 d'*E. tenella* (Katrib, Ikin *et al.* 2012), sa conservation chez d'autres apicomplexes (Stack, Lowther *et al.* 2007; Jia, Nishikawa *et al.* 2010) et sa capacité plus faible à cliver le substrat H-Arg-AMC utilisé par Fetterer (Fetterer, Miska *et al.* 2005; Poreba, McGowan *et al.* 2012).

Afin de visualiser le profil de l'activité observée vis-à-vis du H-Ala-AMC dans les lysats de mérozoïtes et le comparer à celui des oocystes en cours de sporulation, nous avons réalisé un zymogramme natif. D'une manière intéressante, le deuxième signal, différent de celui précédemment associé à *Et*-ApN1, qui est détecté à un poids moléculaire apparent de ~ 130 kDa, est présent tout au long de la sporulation mais persiste également dans les mérozoïtes. La leucyl-aminopeptidase d'*E. tenella* n'est pas transcrite pendant la sporulation (Katrib, Ikin *et al.* 2012). De plus le poids moléculaire théorique de cette protéase est de 58 kDa, ce qui est inférieur au signal visible en zymographie. L'ensemble de ces données est en faveur de l'hypothèse de la présence d'une autre aminopeptidase N active chez *E. tenella*.

Nous avons donc recherché les séquences homologues d'*Et*-ApN1 dans la banque de données du génome d'*E. tenella* (Reid, Blake *et al.* 2010). Trois contigs isolés ont été identifiés (ETH_00038820, ETH_00043935 et ETH_00033545) et nous avons démontré leur appartenance à un même gène. Lors du séquençage de ce gène, les motifs caractéristiques des métallo-protéases M1, $HExxHx_{18}E$ et GAMEN, ont été identifiés (Rawlings and Barrett 1995). Nous avons donc nommé cette protéase *Et*-ApN3. Celle-ci possède de fortes homologies au niveau du site actif avec les autres métallo-protéases de la famille M1. Elle possède notamment un site actif identique à celui de *Tg*-ApN3 suggérant que, comme observé avec *Et*-ApN1 et *Pf*A-M1, *Et*-ApN3 partage de nombreuses caractéristiques communes avec les autres aminopeptidases N parasitaires.

De nombreuses techniques de clonage ont été mises en œuvre pour essayer d'obtenir la séquence des extrémités 5' et 3' d'*Et*-ApN3, cependant elles se sont toutes révélées infructueuses. Nous avons donc produit une protéine recombinante à partir de la séquence partielle d'*Et*-ApN3. La protéine recombinante obtenue étant insoluble, elle a été purifiée en conditions dénaturantes avec 8 M d'urée. Les étapes de dialyse de l'urée provoquent la précipitation d'*Et*-$ApN3_r$. Pour produire des anticorps, nous avons donc supprimé l'urée par électrophorèse et réalisé des injections d'acrylamide broyé contenant *Et*-$ApN3_r$ (Boulard and Lecroisey 1982). Le profil de western blot obtenu avec les Mα-*Et*-ApN3r était relativement similaire à celui obtenu avec les anticorps Lα-*Et*-ApN1r au cours de la sporulation. Une bande de haut poids moléculaire de 130 kDa, puis plusieurs formes ~100, 96, 68 et 45 kDa (contre 120, 96, 68 et 35 kDa pour *Et*-ApN1) ont été détectées. Ces résultats suggèrent que comme *Et*-ApN1, *Et*-ApN3 est synthétisée sous forme d'un précurseur, vraisemblablement la forme

de 130 kDa, qui subit différents clivages au cours de la sporulation. De plus, la présence d'*Et*-ApN3 a été détectée dans les mérozoïtes, ce qui est cohérent avec l'activité de type métallo-protéase M1 observée dans le lysat de mérozoïtes. Il est intéressant de noter qu'en dépit d'un profil de clivage proche, la localisation d'*Et*-ApN3 est très différente de celle d'*Et*-ApN1. *Et*-ApN3 est essentiellement localisée au pôle apical du parasite pendant les étapes précoces du développement suggérant une sécrétion de la protéase dans les stades intracellulaires ou une interaction avec des protéines sécrétées.

Comme la protéine recombinante était inactive, nous n'avons pas pu étudier le clivage de l'H-Ala-AMC par *Et*-ApN3 et prouver qu'elle était active. Nous avons donc analysé indépendamment les 2 signaux détectés en zymographie native avec les séquences d'*Et*-ApN1 et *Et*-ApN3. Nous avons identifié *Et*-ApN3 comme la protéase responsable du signal à ~130 kDa et qui persiste dans le lysat de mérozoïtes. Ces résultats confirment qu'*Et*-ApN3 est une protéase active.

L'ensemble de ces données suggère des rôles différents et complémentaires d'*Et*-ApN1 et *Et*-ApN3. Des travaux sur l'obtention de la séquence complète d'*Et*-ApN3 sont toujours en cours pour produire la protéine recombinante *Et*-ApN3 active afin de pouvoir comparer les préférences de substrat entre les 2 aminopeptidases N d'*E. tenella*. En prenant en compte les homologies qui avaient été révélées entre *Et*-ApN1 et *Pf*A-M1, nous proposons l'hypothèse qu'*Et*-ApN3 pourrait également jouer un rôle dans le métabolisme ou le développement d'*E. tenella*, au stade sporozoïte d'une part mais également dans le stade mérozoïte de 2ème génération d'autre part.

Chapitre 3 : Caractérisation du C36, inhibiteur d'aminopeptidases et son effet sur le développement des parasites apicomplexes

Ces travaux ont été valorisés sous la forme d'un brevet.

Numéro de dépôt 1359289

a. Introduction

La coccidiose aviaire est l'une des plus importantes maladies aviaires, avec un coût annuel de près de 2 milliards d'euros (Williams 1999; Sharman, Smith *et al.* 2010). Cette maladie est causée par les entéropathogènes du genre *Eimeria*, membres du phylum des apicomplexes, dans lequel sont retrouvés d'autres parasites d'importance pour l'Homme, tels que *Toxoplasma gondii* (agent de la toxoplasmose) et *Plasmodium falciparum* (l'un des agents de la malaria (Ajioka 1997). La lutte contre la coccidiose aviaire fait actuellement face à deux problèmes : l'apparition croissante de résistances aux drogues anticoccidiennes, et le coût trop élevé des vaccins, produits à partir de souches atténuées. Les moyens prophylactiques sont utilisés quotidiennement dans tous les élevages de volailles dès l'éclosion des poussins (Peek and Landman 2011). L'apparition de populations parasitaires résistantes aux drogues est donc inévitable en raison de leur utilisation massive au cours du temps (Bafundo, Cervantes *et al.* 2008; Peek 2010; Arabkhazaeli, Modrisanei *et al.* 2013). En Europe, sur la période de 1996 à 2002, la résistance vis-à-vis d'au moins un des anticoccidiens du marché a été observée dans 65 %, 49 % et 59 % des souches de terrain d'*E. acervulina*, d'*E. maxima* et d'*E. tenella*, respectivement (Peek 2010). Les modes d'action/les cibles parasitaires des anticoccidiens étant mal connus, il est difficile de mettre en place une stratégie de contournement de la résistance. Une solution serait la production d'une nouvelle génération d'anticoccidiens avec des drogues nouvelles dont les cibles parasitaires seraient connues, afin de pouvoir travailler sur leurs pharmaco-modulations et ainsi contourner la résistance lorsque celle-ci apparait.

Les aminopeptidases N sont des métallo-protéases de la famille M1 (Rawlings and Barrett 1995). Elles sont présentes chez de nombreux parasites apicomplexes. Nous avons précédemment décrit 2 aminopeptidases N exprimées par le parasite *Eimeria tenella* : *Et*-ApN1 et *Et*-ApN3. L'homologue de ces protéines chez *Plasmodium falciparum*, *Pf*A-M1, (Florent, Derhy *et al.* 1998; Allary, Schrevel *et al.* 2002) est impliqué dans le développement du parasite. L'implication des aminopeptidases dans le développement parasitaire a été révélé par l'utilisation de bestatine, un inhibiteur des aminopeptidases (Nankya-Kitaka, Curley *et al.* 1998). Récemment, il a été montré que l'inhibition spécifique de *Pf*A-M1 par des inhibiteurs dérivés de la bestatine entraîne également un arrêt du développement parasitaire (Harbut, Velmourougane *et al.* 2011; Velmourougane, Harbut *et al.* 2011).

Lors de nos travaux sur les aminopeptidases N d'*E. tenella* nous avons montré que la bestatine inhibe le développement *in vitro* d'*E. tenella* avec une dose 20 fois supérieure à la

dose inhibitrice utilisée dans le modèle de *Plasmodium*. Ces données suggèrent que les aminopeptidases N d'*E. tenella* sont des cibles thérapeutiques potentielles. Des inhibiteurs dirigés contre *Et*-ApN1 pourraient donc conduire à l'arrêt du développement du parasite. Cependant, la concentration nécessaire en bestatine pour inhiber le développement d'*E. tenella* étant 20 fois supérieure à celle de *P. falciparum*, la structure de la bestatine n'est pas une base judicieuse pour développer un tel inhibiteur.

Dans le but d'identifier un nouvel inhibiteur, nous avons travaillé en collaboration avec l'équipe Recherche et Innovation en Chimie Médicinale (RICM) de Cécile Enguehard-Gueiffier et de Mohamed Abarbri à l'Université François-Rabelais de Tours. L'équipe RICM possède une chimiothèque constituée de différentes molécules qu'ils ont synthétisées. Dans cette chimiothèque, une cinquantaine de composés ont été sélectionnés en fonction de leur structure et par comparaison aux inhibiteurs commercialisés. Les composés sélectionnés possèdent cependant des structures inédites et éloignées de celle de la bestatine. Dans cette étude, nous avons choisi de sélectionner les molécules possédant un effet inhibiteur des aminopeptidases N d'*E. tenella* afin de vérifier l'intérêt en tant que cible thérapeutique de ces protéases. Parmi les 50 molécules testées, nous avons identifié une molécule, le C36, capable d'inhiber l'activité des aminopeptidases N mais également capable de bloquer le développement *in vitro* des parasites apicomplexes *E. tenella, T. gondii et P. falciparum*. Malgré ses effets inhibiteurs *in vitro*, le C36 possède un défaut majeur de solubilité entrainant la formation de cristaux, ce qui est incompatible avec les expérimentations *in vivo*. Des premiers essais de pharmaco-modulation de ce composé ont donc été réalisés dans le but d'améliorer sa solubilité. Parmi les 5 dérivés du C36 obtenus, deux possèdent une meilleure solubilité et un effet inhibiteur *in vitro* supérieur à celui du C36. La suite des travaux visera à déterminer si ces inhibiteurs sont efficaces sur des animaux infectés par la coccidiose.

b. Matériels et méthodes

Ethique

Les protocoles expérimentaux sont réalisés en accord avec la loi française (Décret 2001-464 29/05/01) concernant l'utilisation des animaux en laboratoire. Les méthodes de soin et d'euthanasie des animaux sont en accord avec le guide d'éthique national et approuvées par le comité d'éthique de la Région Centre (CL2007-36).

Obtention des parasites *Eimeria tenella* et culture cellulaire

Des groupes de poulets PA12 âgés de 4 à 6 semaines sont infectés oralement avec 10^4 et 10^5 oocystes sporulés des souches d'*E. tenella* Wis/Wis YFP+ et Wis 96, respectivement (Jeffers 1975). Les oocystes non sporulés sont récoltés à partir des caeca infectés 7 et 5 jours après inoculation des animaux avec les souches Wis/Wis YFP+ et Wis 96, respectivement. Les oocystes non sporulés sont ensuite purifiés après un traitement à l'hypochlorite de sodium pour éliminer les bactéries puis une étape de flottation dans du sulfate de magnésium comme décrit précédemment (Shirley 1995). Pour leur permettre de sporuler, les oocystes sont suspendus dans de l'eau contenant 2 % de dichromate de potassium et incubés pendant 72 h à 26°C. Les sporozoïtes sont obtenus à partir d'oocystes fraichement sporulés. Les parois des oocystes sont broyées mécaniquement à l'aide de billes de verre de 0,5 mm et les sporocystes récupérés sont incubés dans du milieu d'excystation (trypsine 0,25 % (Sigma, USA), sels biliaires 0,5 % (VWR, USA) dans du PBS pH 7,5) à 41°C pendant une heure. Les sporozoïtes sont ensuite purifiés par une filtration en deux étapes, la première sur du coton et la seconde sur un filtre de polycarbonate de 5 µM (Whatman, USA). Les cellules MDBK sont maintenues en continu en culture dans du milieu HAM's F12 contenant 10 % de SVF, 2 mM de glutamine, 10 U/mL pénicilline et 10 µg/mL streptomycine comme décrit précédemment (Rieux, Gras *et al.* 2012).

Détection de l'activité enzymatique

Les lysats d'oocystes sont obtenus par destruction mécanique des oocystes avec des billes de verre de 0,5 mm dans du tampon PBS 10 mM pH 7,4. Les lysats sont ensuite soumis à 2 cycles de sonication de 30 s comprenant 5 s d'impulsion d'amplitude 40 (Bioblock scientific, Vibracell 75455, Fisher, USA). Après centrifugation (15 000 g, 30 min, 4°C), les surnageants sont prélevés et la concentration protéique est déterminée par un test au BCA (Smith, Krohn *et al.* 1985). Les lysats sont dilués à une concentration finale de 1 mg/mL et stockés à -80°C.

Pour mesurer l'activité enzymatique, 40 µg de lysat d'oocystes sont incubés dans du tampon de réaction (10 mM phosphate buffer pH 7,4 ; 70 mM NaCl) avec un fluoro-peptide, le H-Ala-AMC ((Ala-(7-Amido-4-methylcoumarin)) (Genecust, Luxembourg), à une concentration finale de 20 µM. L'activité enzymatique est enregistrée (λ excitation = 350 nm et λ émission = 450 nm) pendant 2 min à l'aide d'un spectrofluorimètre (Photon Technology International, USA). Chaque test est réalisé en triplicata. L'activité aminopeptidase correspond à la moyenne des réplicats ± l'écart-type.

Criblage de la banque de composés par tests d'inhibition d'activité aminopeptidase

Cinquante composés provenant de la chimiothèque du laboratoire de l'équipe RICM ont été sélectionnés pour leur partage de structures communes avec des inhibiteurs du marché. L'effet de chaque composé sur l'activité aminopeptidase est évalué en le pré-incubant 10 min avec un lysat d'oocystes avant ajout du substrat fluorescent. L'activité est ensuite mesurée par spectrofluorimétrie comme décrit ci-dessus. La première étape est réalisée en utilisant des groupes de 5 composés en même temps pour une concentration finale de 500 µM. Lorsqu'une inhibition supérieure ou égale à 90 % est observée avec un groupe de composés, ils sont ensuite testés individuellement à une concentration finale de 100 µM. Les composés inhibant l'activité d'au moins 90% sont ensuite testés contre l'activité d'autres protéases (cf. ci-dessous tests de spécificité).

Tests de spécificité

Les composés inhibant l'activité aminopeptidase d'au moins 90 % sont ensuite testés contre l'activité de trois autres protéases : la papaïne (protéine commerciale, protéase à cystéine, Sigma, USA), la trypsine (protéine commerciale, protéase à sérine, Sigma, USA) et *Et*-ApN1$_r$ (protéine recombinante, métallo-protéase). Le tampon utilisé pour enregistrer l'activité de la papaïne est un tampon acétate 100 mM pH 5,5 et le substrat utilisé est le ZFR-AMC (Bloquant-Phe-Arg-AMC). Le tampon pour la trypsine est du PBS 10 mM pH 7,4 et avec du ZFR-AMC en substrat (Rieux, Gras *et al.* 2012). Le tampon pour *Et*-ApN1$_r$ est PBS 10 mM pH 7,4 et avec du H-Ala-AMC en substrat. L'activité est enregistrée comme décrit ci-dessus. Le composé est ajouté (100 µM final) 10 min avant l'addition du substrat et l'activité résiduelle est exprimée en % par rapport à un contrôle sans inhibiteur. Chaque test est réalisé en triplicata. La valeur d'activité indiquée est une moyenne des trois expérimentations avec

l'écart type. Pour les inhibiteurs les plus spécifiques, des tests avec une concentration en composé finale de 50 µM sont réalisés comme décrit ci-dessus.

Tests de cytotoxicité

Pour les composés inhibant plus spécifiquement l'activité aminopeptidase, leur toxicité aigüe est évaluée en les incubant avec des cellules MDBK pendant 4, 24, 48 et 72 h à une concentration de 10 et 50 µM. Seuls les composés ne détruisant pas le tapis cellulaire sont conservés pour la suite de l'étude. L'absence de cytotoxicité pour les composés ne détruisant pas le tapis cellulaire est vérifiée par un test au MTT (Mosmann 1983). L'effet des composés ne présentant pas de cytotoxicité est ensuite évalué *in vitro* sur des cellules infectées par *E. tenella*.

Effets sur des cultures cellulaires infectées par *E. tenella*

Des sporozoïtes (2×10^5) d'*E. tenella* exprimant constitutivement la « Yellow Fluorescent protein » (Wis YFP+) sont incubés avec 2×10^5 cellules MDBK dans des plaques 24 puits. Différentes concentrations de composé (1 - 50 µM) sont ajoutées. Les cellules sont mises en culture pendant 4 h et 96 h à 41°C, et 5 % CO_2 comme décrit précédemment (Rieux, Gras *et al.* 2012). Pour les tests d'invasion, les cellules infectées sont lavées et fixées au paraformaldéhyde (Marquardt, Pafume *et al.*) 2,7 % à 4 h post infection (p.i.). Les lamelles sont ensuite mises en contact avec du Vectashield contenant 1,5 µg/mL de DAPI (CliniSciences, France). Les lames sont observées au microscope à fluorescence (Zeiss Axiovert 200 microscope, Carl Zeiss, Germany). Chaque expérimentation a été réalisée en duplicata pour chaque condition et reproduite 3 fois de manière indépendante. Pour les tests de développement, à 96 h, les mérozoïtes présents dans le surnageant de culture de chaque condition ont été comptés. Les expériences ont été réalisées en triplicata. Les taux de développement et d'invasion sont évalués en pourcentages par rapport à des cellules non traitées et exprimés sous la forme de la moyenne et des écarts-types des 3 expérimentations.

Obtention des parasites *Toxoplasma gondii*

Les parasites *Toxoplasma gondii* RH nous ont été fournis par l'équipe « Contrôle et Immunologie des Maladies Entériques du Nouveau-né » (Souza, do Nascimento *et al.*) de l'INRA Centre Val de Loire de Tours. Pour permettre l'utilisation de parasites frais, ils sont maintenus en continu en culture cellulaire sur des « Human Foreskin Fibroblasts » (HFF) dans

un milieu « Dulbecco's minimal essential medium » (DMEM) contenant 10 % de SVF, 2mM de glutamine, 10 U/mL pénicilline et 10 µg/mL streptomycine comme décrit précédemment **(Roos, Donald *et al.* 1994)**.

Effets sur les cultures cellulaires infectées par *T. gondii*

Des plaques de 6 puits contenant des HFF à confluence sont infectées avec 2 x 10^4 tachyzoïtes de *T. gondii* RH par puits avec différentes concentrations de composés (1 à 50 µM). Les plaques sont incubées à 37°C avec une atmosphère contenant 5 % de CO_2. Après 96 h, les cellules sont fixées 5 min en méthanol froid puis colorées avec du crystal violet (2,5 % Sigma, USA) pendant 10 min. Les plages de lyse parasitaires, signes du développement de *Toxoplasma,* apparaissent en zone claire en opposition avec le bruit de fond violet des cellules HFF confluentes. Les expériences ont été réalisées en duplicata. L'inhibition du développement est estimée par la surface des plages de lyses. Pour chaque condition, la surface de 10 plages de lyses a été mesurée avec le logiciel Zeiss Axiovision. La surface des plages de lyses est exprimée sous la forme de la moyenne et des écarts-types des 2 expérimentations.

Obtention des parasites *Plasmodium falciparum*

L'ensemble des manipulations sur *Plasmodium falciparum* a été réalisé par l'équipe « Dynamique des Interactions Membranaires Normales et Pathologiques » d'Henri Vial, à l'Université Montpellier 2.

La souche de *P. falciparum* 3D7 a été précédemment décrit (Caldarelli, Hamel *et al.* 2012). La parasitémie est suivie par une coloration au Giemsa (Mélange de bleu de méthylène, éosine et azure B) qui marque les noyaux des parasites. Le milieu de culture « Roswell Park Memorial Institute medium » (RPMI 1640) contient du bicarbonate de sodium (110 mg/L), du glucose (2 g/L), de la Thymidine (2,5 mg/L), de la gentamicine (10 mg/L) et de l'Albumax I (0,5 %, Invitrogen, USA) et 10 % de sérum humain (Caldarelli, El Fangour *et al.* 2013). Pour le marquage avec des isotopes radioactifs, les parasites sont cultivés dans du milieu RPMI sans choline, inositol et sérine.

Effets sur les cultures cellulaires infectées par *P. falciparum*

L'effet des composés sur le développement *in vitro* de *P. falciparum* 3D7 est évalué en suivant l'incorporation de l'hypoxanthine. Les parasites sont synchronisés au stade en anneau

avec 5 % de D-sorbitol. Ils sont ensuite lavés trois fois en milieu dépourvu d'hypoxanthine, suspendus dans un milieu contenant une faible concentration d'hypoxanthine (200 nM) et dilués à une parasitémie de 1 % dans ce milieu. Dans une plaque de 24 puits, 990 µL/puits de cette culture infectée sont déposés avec 10 µL de composé à différentes concentrations (10 nM à 1 mM). Les plaques sont incubées à 37°C pendant 48 h. Après 2 jours, 200 µL de culture sont transférés en triplicata dans des plaques de 96 puits et 25 µL [^{3}H] hypoxanthine sont ajoutés (0,5 µCi/puits). La plaque est incubée pendant 16 h à 37°C et la radioactivité des parasites est mesurée. Les données sont converties en pourcentage d'inhibition de la croissance de *P. falciparum* et la concentration pour laquelle 50 % du développement est inhibé (IC50) est calculée. La valeur d'IC50 *in vitro* est la moyenne d'au moins deux expérimentations indépendantes où chaque condition est réalisée en duplicata (Peyrottes, Caldarelli *et al.* 2012).

Procédure générale de production des pyrano-indoles.

L'ensemble des manipulations de synthèse de composés chimiques a été réalisé par le laboratoire RICM.

L'ensemble de ces composés a été synthétisé comme précédemment décrit (Inack Ngi, Guilloteau *et al.* 2011). Brièvement, 522 mg de carbonate de potassium (K_2CO_3, 4 mmol) et 750 mg de d'acide carboxylique iodoindole ($C_9H_6INO_2$, 2 mmol) ont été introduits dans un tube Schlenk équipé d'un agitateur magnétique recouvert de téflon. Puis 15 mL Diméthyl-formamide (DMF) sont ajoutés et la suspension est mise sous agitation pendant 15 min. Les gaz formés sont évacués à froid pendant 10 min et remplacés par de l'Argon. Une fois la température ambiante atteinte, de l'alcyne (4 mmol) et de l'iodure de cuivre (CuI, 2 mmol) sont ajoutés. Le tube de Shlenk est placé dans un bain d'huile préchauffé à 126°C pendant 48 h sous agitation. La température à l'intérieur du tube doit être entre 120 et 123°C. La solution est ensuite ramenée à température ambiante avant hydrolyse à 0°C avec une solution aqueuse saturée en chlorure d'ammonium (NH_4Cl, 15 mL). De l'éther diéthylique (Et_2O) est ajouté dans le tube de Schlenk et le mélange est filtré sur Celite. Après extraction à l'Et_2O, la phase organique est lavée plusieurs fois à l'eau, séchée sur du sulfate de magnésium ($MgSO_4$), filtrée sur coton puis évaporée. Le matériel brut obtenu est purifié par Flash-chromatographie sur gel de silice pour donner les pyrano-indoles désirés

C36 :

Diethyl-2-[(9-benzyl-1,9-dihydroindolo[2,3-c]pyrane-3-yl)-methyl]-2-(prop-2-ynyl)malonate.

Rendement: 30%; solide blanc. Mp: 165_166 _C.

Infrarouge (IR) sur plaque de bromure de potassium (KBr): 3256, 1735, 1709, 1628.

Résonance magnétique nucléaire des hydrogènes (^{1}H RMN) : (300MHz,CDCl3): 1.31 (t, 6H, J = 7.1), 2.15 (t,1H, J = 2.5), 2.87 (d, 2H, J = 2.5), 3.44 (s, 2H), 4.25_4.37 (m, 4H), 5.89 (s, 2H), 6.90 (s, 1H), 7.01_7.34 (m, 6H), 7.40_7.50 (m, 2H), 7.89 (d, 1H, J = 8.0).

Résonance magnétique nucléaire des carbones (^{13}C RMN) : (75 MHz, CDCl3): 14.1, 22.9, 36.3, 48.1, 56.3, 62.3, 72.2, 79.0, 102.0,111.5, 121.2, 121.3, 121.8, 125.6, 126.4, 127.1, 127.6, 128.1, 128.8, 137.5, 140.9, 151.2, 156.7, 169.3.

Spectrométrie de masse par ionisation électronique (MS) : (70 eV, EI) m/z (%) = 485 (M•+, 19), 441 (40), 368 (17), 367 (33), 294 (11), 288 (17), 91 (100).

Spectrométrie de masse par ionisation par électro-spray (HRMS/ESI): Masse théorique de C29H27NO6 (M+H) 486.1911, masse observée par ESI 486.1914.

C36.01

9-Benzyl-3-phenylindolo[2,3-c]pyrane-1(9H)-one.

Rendement: 40%; solide jaune. Mp: 160_161 _C.

IR (KBr): 3025, 2939, 1716, 1616, 1605, 1526.

^{1}H RMN (300MHz, $CDCl_3$): 5.97 (s, 2H), 7.20_7.53 (m, 12H), 7.92_8.00 (m, 3H).

^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$): 48.2, 97.3, 100.1, 111.6, 121.0, 121.4, 121.8, 125.1, 126.5, 127.2, 127.7, 128.3, 128.8,129.0, 129.3, 132.7, 137.5, 141.2, 153.0, 156.8.

MS (70 eV, EI) m/z (%) = 351 (M•+, 100), 260 (59), 232 (23), 204 (18), 105 (12), 91, 45, 77 (14).

HRMS (ESI): Masse théorique de C24H17NO2 (M+H) 352.1332, masse observée par ESI 352.1322.

C36.02

9-Benzyl-3-methoxyindolo[2,3-c]pyrane-1(9H)-one.

Rendement: 77%; solide incolore. Mp: 121_122 _C.

IR (KBr): 3069, 1698, 1626, 1615, 1212, 1084.

^{1}H RMN (300MHz, $CDCl_3$): 3.50 (s, 3H), 4.36 (d, 2H, J = 0.7), 5.90 (s,2H), 7.00 (s,1H), 7.20_7.32 (m, 6H), 7.45_7.50 (m, 2H), 7.90 (d, 1H, J = 8.0).

^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$): 48.0, 58.9, 71.0, 99.9, 111.5, 120.7, 121.3, 121.4, 121.7, 125.4, 127.1, 127.6, 128.1, 128.7, 137.4, 140.8, 152.3, 156.9.

MS (70 eV, EI) m/z (%) = 319 (M•+,68), 288 (27), 260 (8), 168 (11), 91 (100).

HRMS (ESI): Masse théorique de C20H17NO3 (M+H) 320.1281, masse observée par ESI 320.1276.

C36.03

(E)-9-Benzyl-3-[2-(2,6,6-trimethylcyclohex-2-enyl)vinyl]-indolo[2,3-c]pyrane-1(9H)-one.

Rendement: 70%; solide orange. Mp: 86_88 _C.

IR (KBr): 3060, 3031, 1710, 1640, 1593.

^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$): 0.92 (s, 3H), 0.97 (s, 3H), 1.20_1.28 (m, 1H), 1.49_1.60 (m, 1H), 1.65 (d, 3H, J = 1.3), 2.02_2.12 (m, 2H), 2.30 (d, J = 9.5, 1H), 5.50 (bs, 1H), 5.92 (s, 2H), 6.12 (d, 1H, J = 15.4), 6.46 (dd, 1H, J = 15.4/ 9.5), 6.76 (s, 1H), 7.24_7.30 (m, 6H), 7.45_7.53 (m, 2H), 7.87 (d, 1H, J = 8.0).

^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$): 23.2, 23.2, 27.1, 28.1, 31.4, 32.8, 48.1, 54.8, 99.3, 111.5, 120.8, 121.2, 121.6, 121.8, 121.9, 123.3, 126.6, 127.2, 127.6, 128.1, 128.8, 133.3, 135.8, 137.6, 141.0, 152.0, 156.9.

MS (70 eV, EI) m/z (%) = 423 (M•+, 41), 368 (12), 367 (40), 331 (24), 301 (20), 289 (10), 288 (39), 91 (100).

HRMS (ESI): Masse théorique de C29H29NO2 (M+H) 424.2271, masse observée par ESI 424.2279

C36.04

5-Benzyl-3-pentylindolo[3,2-c]pyrane-1(5H)-one.

Rendement: 76%; solide incolore. Mp: 123_125 _C.

IR (KBr): 3155, 3034_2872, 1793, 1713, 1626, 1608.

^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$): 0.88 (t, 3H, J = 6.4), 1.27_1.35 (m, 4H), 1.65_1.80 (m, 2H), 2.57 (t, 2H, J = 7.9), 5.38 (s, 2H), 6.29 (s, 1H), 7.03_7.12 (m, 3H), 7.27_7.35 (m, 6H), 7.97_8.03 (m, 1H).

^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$): 14.1, 22.5, 27.1, 31.3, 34.6, 47.7, 92.7, 99.6, 109.9, 121.4, 122.8, 124.5, 126.3, 128.2, 129.2, 135.7, 138.4, 146.7, 160.2, 164.5.

LRMS (ESI) 346 (M+H).

HRMS (ESI): Masse théorique de C23H23NO2 (M+H) 346.1729, masse observée par ESI 346.1736.

C36.05

5-Benzyl-3-hydroxypropylpyran[4,3-*b*]indol-1(*5H*)-one

Rendement: 63%; solide orange. Mp: 149-151 °C.

IR (KBr): 3413, 2930-2860, 1694, 1559.

^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$): 1.71 (bs, 1H), 1.92-2.05 (m, 2H), 2.73 (t, 2H, J = 7.3), 3.71 (t, 2H, J = 6.1), 5.38 (s, 2H), 6.36 (s, 1H), 7.03-7.10 (m, 2H), 7.23-7.39 (m, 6H), 8.18-8.26 (m, 1H).

^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$): 30.3, 31.0, 47.3, 61.7, 93.2, 99.7, 110.0, 121.4, 122.9, 124.5, 124.7, 126.4, 128.2, 129.2, 135.7, 138.5, 146.6, 160.2, 163.6.

LRMS (ESI) 333 (M+H), 356 (M+Na); 372 (M+K).

HRMS (ESI): calcul anal. pour $C_{21}H_{19}NO_3$ (M+H) 333.1365, mesuré 333.1367.

Modélisation de l'interaction avec *Et*-ApN1

La simulation de l'interaction entre la bestatine et *Et*-ApN1 a été réalisée par Sheena McGowan. Elle est issue de la comparaison informatique entre le modèle 3D d'*Et*-ApN1 réalisé à partir de la structure de l'aminopeptidase N d'*E. coli* (Addlagatta, Gay *et al.* 2008) et de la structure cristallographique du complexe de *Pf*A-M1 / bestatine (McGowan, Porter *et al.* 2009).

Estimation des paramètres physico-chimiques

Le C36 et ses analogues sont analysés par le logiciel OSIRIS (Actelion) pour obtenir une estimation de leurs paramètres physico-chimiques (Vermeire, Aldenberg *et al.* 2013). Le logiciel calcule le LogP (estimation de l'hydrophylie ; doit être compris entre 0 et 5), LogS (estimation de la solubilité, doit être supérieure à -4), Mw (estimation du poids moléculaire), Drug likeness (évaluation du potentiel en tant que drogue, doit être supérieure à 0) et le Drug score (estimation du potentiel global de la molécule en tant que drogue, doit être le plus grand possible) en fonction de la structure. Les valeurs de référence ont été obtenues par comparaison de plus de 3000 drogues actuellement commercialisées, pour estimer les valeurs les plus récurrentes des différents paramètres. L'ensemble des analogues est comparé au C36.

Analyses statistiques

Les différences intergroupe (p value) sont évaluées par un test de Student apparié. La limite de significativité a été fixée à p = 0.05

c. Résultats

Criblage d'une banque de molécule à la recherche d'inhibiteurs d'aminopeptidases N

Dans le but d'identifier de nouvelles classes de composants pouvant être utilisés dans la lutte contre la coccidiose aviaire, nous avons criblé 50 composés chimiques. La sélection a été effectuée en fonction de la capacité de ces composés (C) à inhiber l'activité des protéases récemment caractérisées comme potentiellement impliquées dans le développement intracellulaire d'*E. tenella*, *Et*-ApN1 et *Et*-ApN3. La première étape de sélection a été réalisée en utilisant des groupes (G) de 5 composés à une concentration finale de 500 µM (100 µM de chaque composé) contre l'activité aminopeptidase N d'un lysat d'oocystes non sporulés (Figure 43). Nous avons fixé le seuil de sélection des composés à une inhibition supérieure ou égale à 90 %.

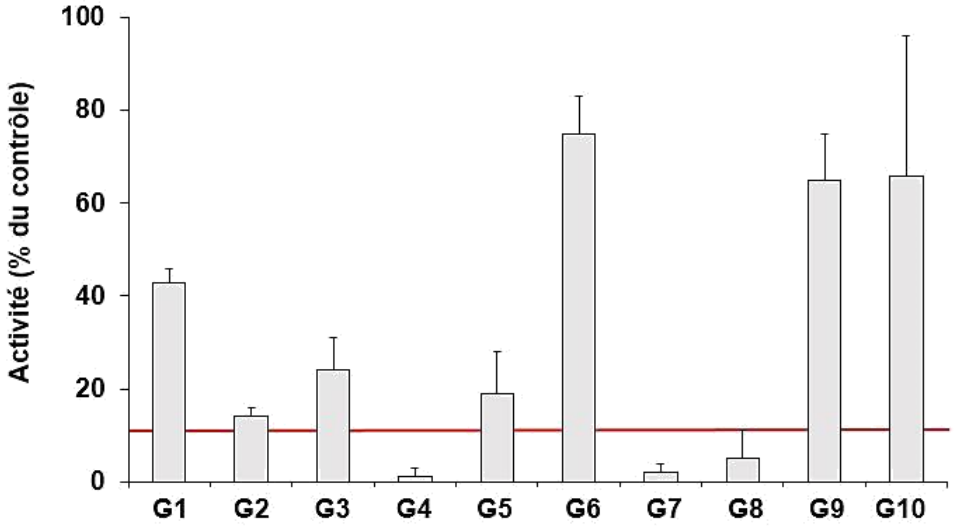


Figure 43 : Sélection des groupes de composés

Chaque groupe (G) a été testé à une concentration finale de 500 µM (100 µM par inhibiteur) vis à vis l'activité aminopeptidase N d'un lysat d'oocystes non sporulés. Sur les 10 groupes testés, seul les 3 entrainant une inhibition supérieure à 90% (barre noire) ont été sélectionnés.

Parmi les 10 groupes testés seuls 3 groupes, G4 (C17 à C21) ; G7 (C32 à C36) et G8 (C37 à C41), possèdent un effet inhibiteur de 90 % ou plus. Les 15 composés ainsi sélectionnés ont été testés indépendamment, à une concentration de 100 µM finale (Figure 44). Seuls les composés C21, C34, C36, C38 et C39 présentent un pouvoir inhibiteur supérieur ou égal à 90 %, à la concentration de 100 µM, dans nos conditions expérimentales.

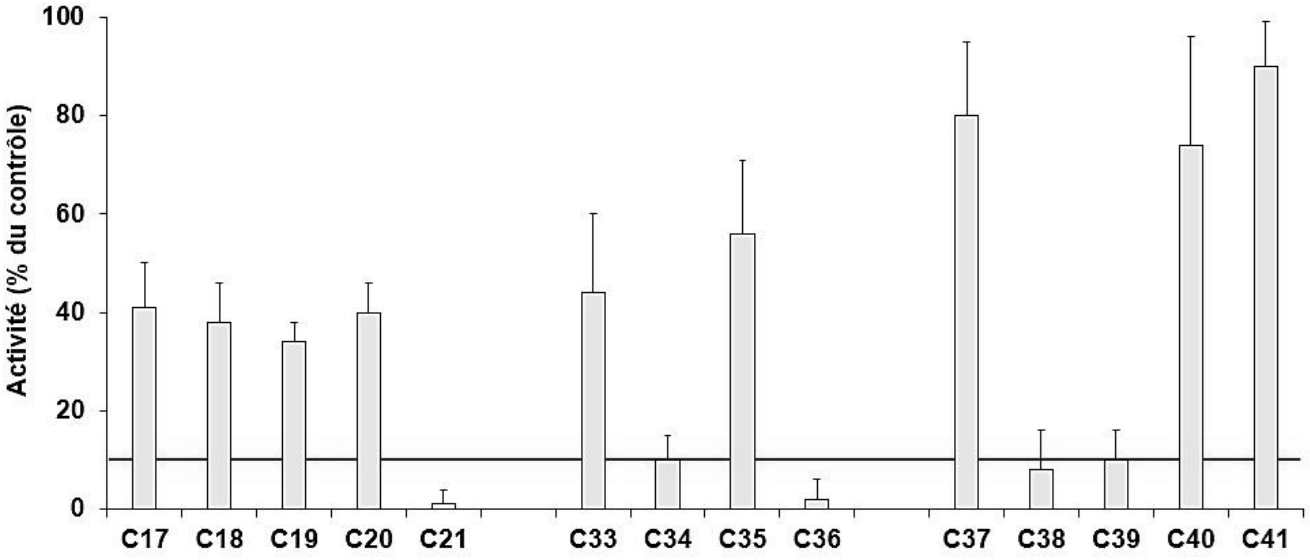


Figure 44 : Sélection des composés

Tests des différents inhibiteurs composants les 3 groupes sélectionnés de manière indépendante vis à vis l'activité aminopeptidase N d'un lysat d'oocystes non sporulés. Sur les 15 composés testés (C32 n'est pas présent car il présentait de l'auto-fluorescence), seuls les composés avec un effet inhibiteur supérieur ou égal à 90 % (barre noire) ont été sélectionnés.

Afin de sélectionner les inhibiteurs les plus spécifiques de l'activité aminopeptidase, la spécificité relative de ces 5 composés a été évaluée sur les activités des aminopeptidases (métallo-protéases), de la papaïne (protéase à cystéine) et de la trypsine (protéase à sérine) à une concentration finale de 100 µM (Figure 45). Les composés C38 et C39 présentent une inhibition plus importante sur l'activité des protéases à cystéine que sur l'activité aminopeptidase N et ont été exclus de l'étude. Les composés C21, C34 et C36 semblent plus spécifiques de l'activité aminopeptidase.

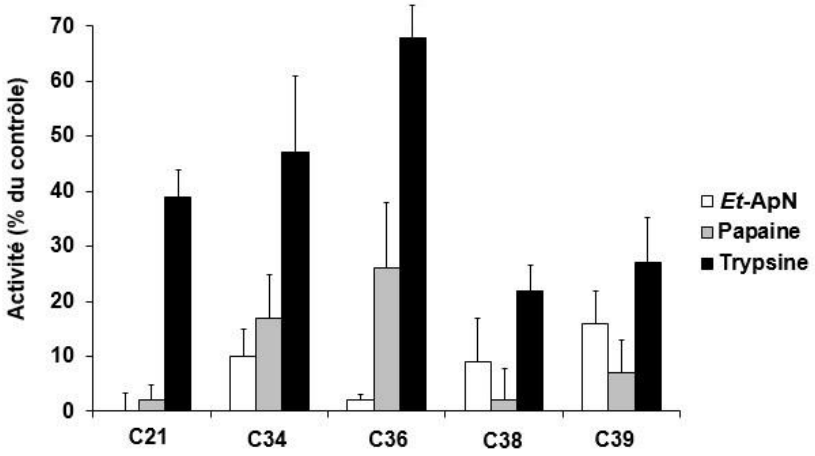


Figure 45 : Tests de spécificité relative

Les composés C21, C34, C36, C38 et C39 ont été testés à 100 µM vis-à-vis de l'activité aminopeptidase N d'un lysat, l'activité de la papaïne et de la trypsine purifiée. Seuls les composés présentant une plus forte spécificité d'inhibition pour l'activité aminopeptidase N ont été sélectionnés.

Il faut noter que les C21 et C34 présentent un impact relativement plus important sur les protéases à cystéine et sérine que le C36. Afin de compléter notre sélection, la cytotoxicité relative de ces trois composés a été testée sur des cellules MDBK à 10 et 50 µM. Les C21 et C34 ont montré une toxicité aigüe qui entraîne la mort et la dissociation du tapis cellulaire dans les premières 24 h d'incubation. En revanche, aucun effet cytotoxique visible n'a été observé pour le C36. Le C36 a donc été sélectionné pour la suite des expérimentations. Pour évaluer de manière plus fine la spécifié du C36, des tests complémentaires ont été réalisés à une concentration de 50 µM qui est la concentration maximale utilisée dans les tests de cytotoxicité. L'effet inhibiteur du C36 a également été testé vis-à-vis de l'activité de la protéine recombinante, *Et*-ApN1$_r$, (Figure 46A).

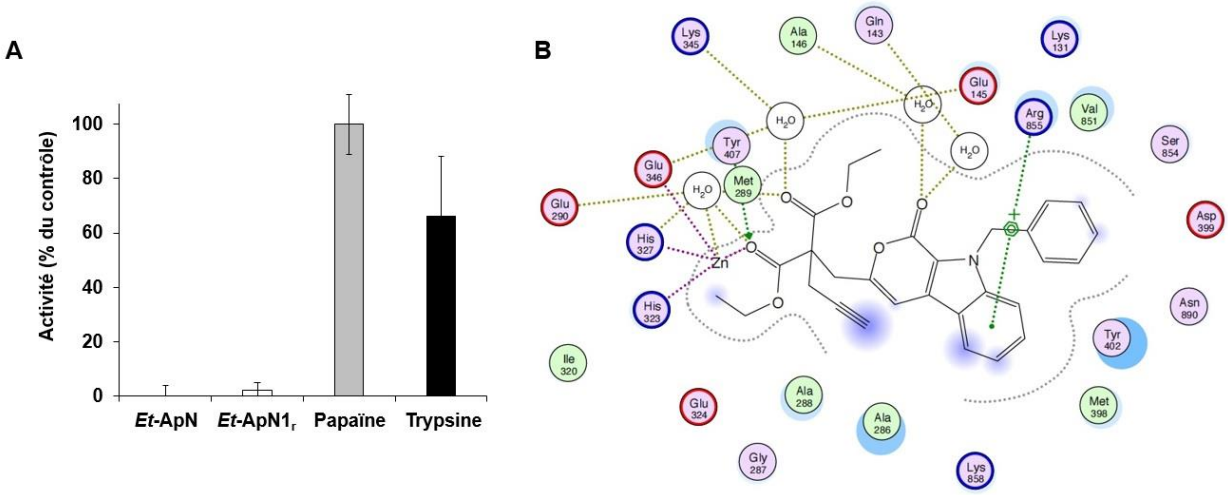


Figure 46 : C36 inhibiteur d'aminopeptidase N

A, Profil d'inhibition du C36 à 50 µM vis-à-vis de l'activité aminopeptidases N d'un lysat d'oocystes (*Et*-ApN), la protéine recombinante Et-ApN1$_r$, contre la papaïne (Papaïne) et la trypsine (Trypsine) purifiées. *B*, Modélisation de l'interaction entre le C36 et *Et*-ApN1$_r$, en bleu sont représentées les zones hydrophobes.

À 50 µM, une forte inhibition des activités aminopeptidases et de l'activité de la protéine recombinante *Et*-ApN1r est observée (98 à 100 % d'inhibition) (Figure 46A). Ce résultat confirme l'interaction entre le C36 et *Et*-ApN1 et suggère qu'il interagit d'une manière similaire avec les autres aminopeptidases N. L'interaction a été modélisée (46B) et montre que le C36 peut se positionner dans le site catalytique de *Et*-ApN1. L'ensemble de ces données indique que le C36 n'est pas un inhibiteur global des protéases mais qu'il inhibe spécifiquement les métallo-protéases de type aminopeptidase N. Le C36 ne présentant pas de signe de cytotoxicité aigue et ayant un effet inhibiteur de l'activité des aminopeptidases N d'*E. tenella*, ses effets *in vitro* sur le cycle biologique du parasite ont été évalués.

Inhibition du développement d'*E. tenella* par le C36

Afin de confirmer l'absence de cytotoxicité du C36, nous avons réalisé un test au MTT sur des MDBK, à confluence, en présence de 10 et 50 µM de C36 pendant 3 jours (Figure 47A). Aucune différence significative n'est observée entre le taux de viabilité des cellules traitées avec le solvant DMSO (Contrôle) et celui des cellules traitées avec le C36. L'absence de cytotoxicité étant avérée, nous nous sommes intéressés aux effets *in vitro* du C36 sur le cycle d'*E. tenella*. Nous avons cherché à caractériser l'influence du C36 sur le développement du parasite (Figure 47B et 5C). Des MDBK ont été infectées avec des sporozoïtes Wis YFP+, en présence de concentrations variables de C36 (1 à 50 µM).

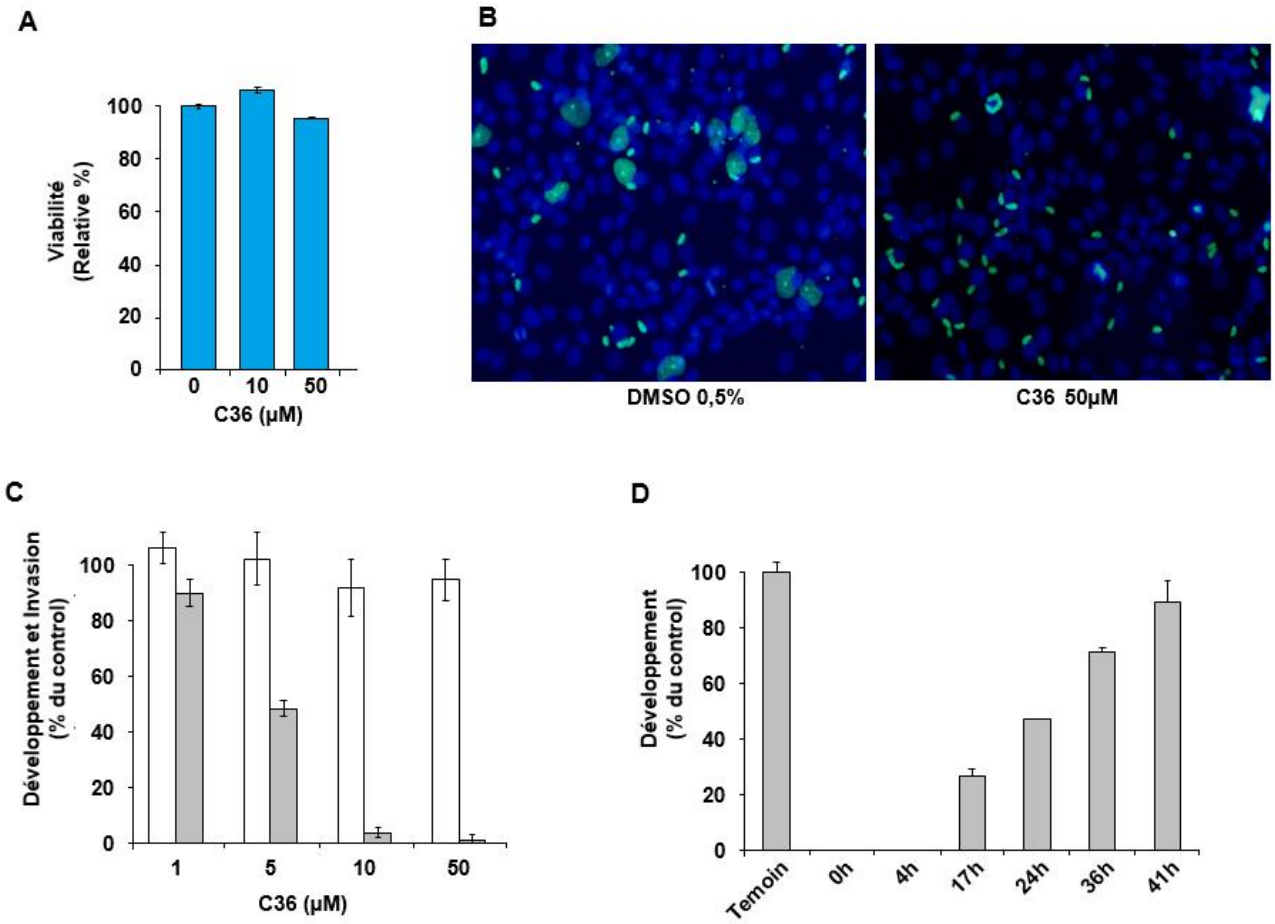


Figure 47 : C36 inhibiteur du développement d'*E. tenella*

A, Tests au MTT. Les cellules sont mises en présence du composé C36 à différentes concentrations (0 – 50 µM) pendant 3 jours avant de réaliser le test MTT. *B*, Observation microscopique du développement d'*E. tenella*. En présence de DMSO, on observe les sporozoïtes et leur forme de développement les schizontes (large forme ovale verte). En présence de C36 à 50 µM, les schizontes sont très peu abondants, illustrant l'inhibition du développement. C, Invasion et développement d'*E. tenella* en présence de C36. L'invasion (blanc) n'est pas influencée par l'augmentation de la concentration de C36, contrairement au développement (gris) qui est très fortement inhibé. D, Fenêtre d'action du C36. Le C36 (50 µM) est ajouté à différents temps de développement. Celui-ci n'est efficace que s'il est ajouté avant les premières 24 h qui suivent l'invasion.

Avant d'évaluer les effets du C36 sur le développement, l'absence d'effet sur l'invasion a été vérifiée. Aucune différence significative de pourcentage d'invasion entre les différentes concentrations de C36 et le contrôle n'est observée, indiquant que le C36 ne modifie pas le processus d'invasion des cellules par *E. tenella* (Figure 47B et 47C, blanc). En revanche, une inhibition dose dépendante du développement (nombre de schizonte / nombre de sporozoïtes ayant envahis) est observé avec le C36 (Figure 47B et 47C, gris). Comme illustré en Figure 44B pour le témoin DMSO, la présence des stades de développement est observée : des schizontes (larges formes rondes vertes) sont présents parmi les sporozoïtes (petites formes allongées vertes) ayant envahi les cellules. En présence de C36 à 50 µM, aucun schizonte n'est observé indiquant que le développement du parasite a été inhibé. Cette inhibition dose dépendante a une IC_{50} proche de 5 µM pour *E. tenella*.

Afin de mieux comprendre le mécanisme d'action de l'inhibition, nous avons étudié la fenêtre d'action du C36. Nous avons ajouté le composé à différents temps et observé l'effet sur la production de mérozoïtes (stade qui suit le schizonte) dans le milieu de culture. Si le composé est ajouté dans les 24 h post infection (p.i.), il inhibe le développement. Lorsque le composé est ajouté à 24 h p.i., le développement est inhibé d'environ 50 %. Au-delà de 24 h p.i., l'efficacité de l'inhibition diminue drastiquement. Ces résultats indiquent que le C36 n'est efficace que s'il est ajouté avant le début de la différenciation en schizonte. Une fois la différenciation initiée, le C36 n'a plus d'effet. Le C36 inhibant fortement le développement d'*E. tenella*, nous nous sommes intéressés à son effet sur d'autres parasites apicomplexes.

Conservation de l'effet inhibiteur sur d'autres parasites apicomplexes

Nous avons, dans un premier temps, testé l'efficacité du C36 contre le développement de *T. gondii*, une autre coccidie proche d'*E. tenella* (Figure 48). Nous avons d'abord vérifié que l'activité aminopeptidase d'un lysat de tachyzoïtes pouvait être inhibée par le C36, puis nous avons recherché a caractériser l'effet du C36 sur l'invasion des cellules HFF par *T. gondii* (Annexe 2). Comme pour *E. tenella*, aucune différence significative n'est observée sur le pourcentage d'invasion en présence et en absence de C36. L'impact du C36 sur le développement de *T. gondii* a été évalué par un test de plage de lyse avec des concentrations de C36 allant de 0 à 50 µM (Figure 48). La surface des plages de lyse (plages claires) diminue de manière dose dépendante en fonction de la concentration du C36. L'IC_{50} du C36 est approximativement de 1 µM. Le C36 possède un effet inhibiteur similaire vis-à-vis des deux coccidies.

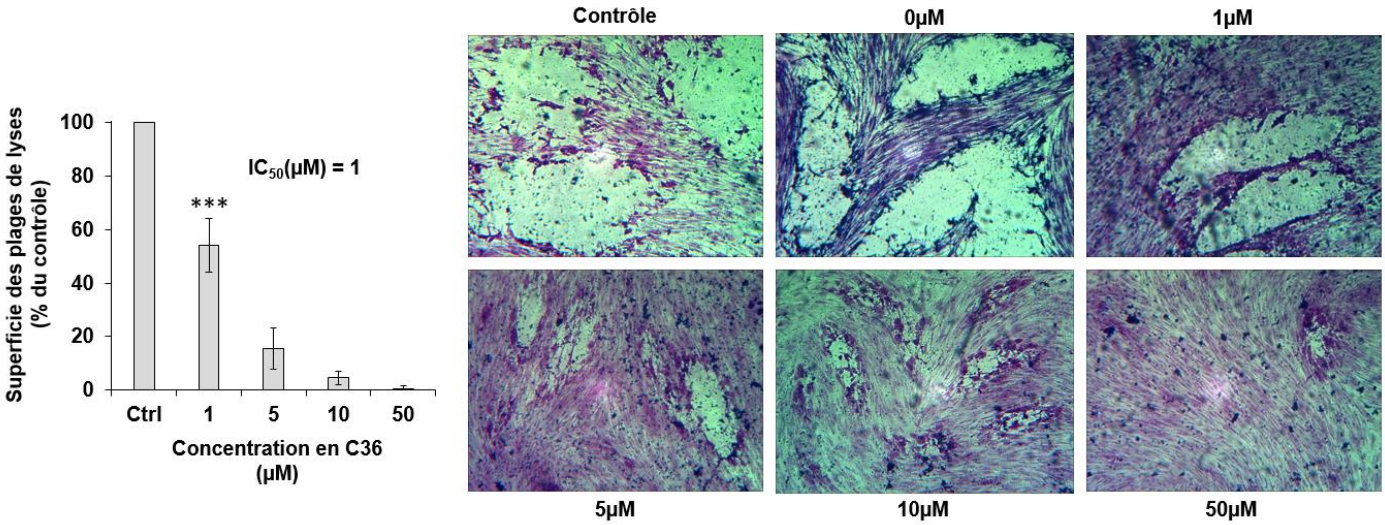


Figure 48 : C36 inhibiteur du développement de *Toxoplasma gondii*

Le C36 inhibe la formation des plages de lyse. La surface des plages de lyse (plages claires) diminue fortement en présence de concentrations croissantes de C36. L'IC50 du C36 est d'environ 1 µM. Les valeurs sont les moyennes de 10 plages de lyses avec leurs écart-types. *** ($p<0,001$)

Afin de confirmer si le C36 conserve son effet inhibiteur du développement sur d'autres parasites du phylum des apicomplexes, nous avons réalisé des tests sur le développement de *Plasmodium falciparum* (Figure 49) en collaboration avec l'équipe Dynamique des Interactions Membranaires Normales et Pathologiques d'Henri Vial, Université Montpellier 2.

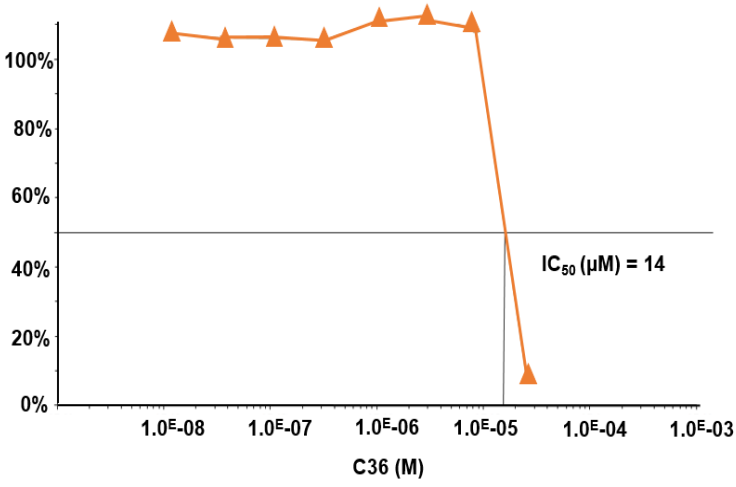


Figure 49 : C36 inhibiteur du développement de *Plasmodium falciparum*

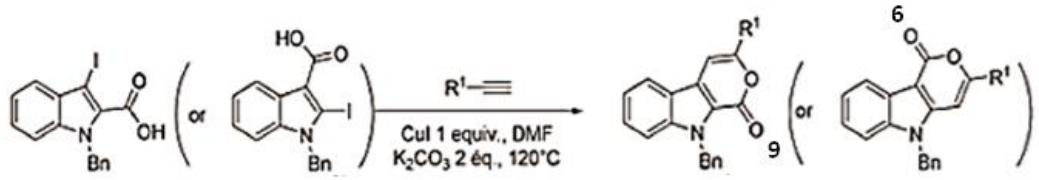
L'effet du C36 sur le développement de *P. falciparum* a été évalué par l'incorporation de [^{3}H] hypoxanthine dans le noyau des parasites pendant 16 h après culture en présence de différentes concentrations de C36. Le C36 conserve son effet inhibiteur sur le développement de *Plasmodium* et l'IC_{50} du C36 sur le développement de ce parasite est de 14 µM.

La parasitémie des hématies est évaluée par incorporation de [^{3}H] hypoxanthine, après la croissance en présence de différentes concentrations de C36. La parasitémie chute radicalement entre 10 et 100 µM de C36, illustrant l'inhibition du développement de *P. falciparum* en présence du composé C36. L'IC_{50} sur le développement de *Plasmodium in vitro* est de 14 µM. L'ensemble de ces données permet d'émettre l'hypothèse que le C36

conservera un effet inhibiteur sur le développement pour d'autres parasites apicomplexes. En Cependant, l'IC_{50} élevée et la solubilité limitée du C36 ne sont pas compatibles pour une évaluation *in vivo* de ses propriétés inhibitrices du développement parasitaire. Pour améliorer ces paramètres, des expériences de pharmaco-modulation du C36 ont été entreprises.

Synthèse des analogues, analyses de leurs paramètres et tests *in vitro*.

Afin d'améliorer la solubilité du C36, 5 premiers dérivés ont été synthétisés par l'équipe RICM de l'Université François Rabelais de Tours. Les premières modifications réalisées avaient pour but d'étudier le rôle potentiel du groupement alcyne et CO des carbones 8 et 9 de la molécule. Pour se faire, différents analogues du C36 ont été synthétisés avec l'utilisation de différents dérivés d'alcyne lors de la cyclisation et avec une variation de la position du groupement CO entre les positions 9 et 6 (Figure 50).



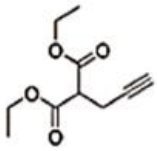
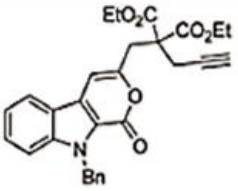
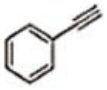
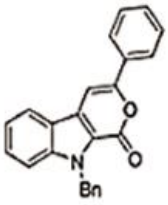
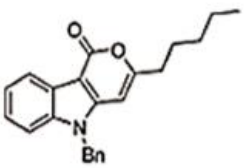
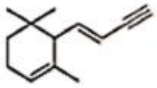
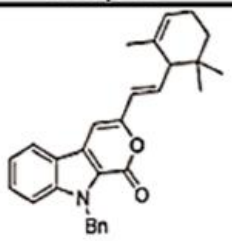
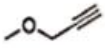
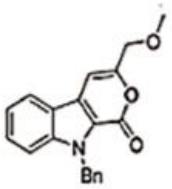
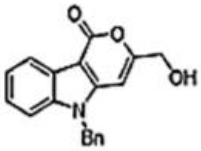
Num.	Alcyne	Composé	Rend. (%)
36			30
36 01			40
36 02			76
36 03			70
36 04			77
36 05			63

Figure 50 : C36 et ses analogues.

Tableau de synthèse des différents analogues du C36 avec le groupe alcyne ajouté, la structure et le rendement de la synthèse. La variation de position de double liaison entre les positions 6 et 9 est illustrée en haut à droite.

Sur les cinq analogues synthétisés, 3 possèdent des groupements alcyne de haut poids moléculaire comparables à celui du C36 (C36.01, C36.02 et C36.03) et 2 des groupements plus légers (C36.04 et C36.05). Les composés C36.02 et C36.05 possèdent en plus, une variation de position du CO qui se trouve sur le carbone 6 à la place du carbone 9. Pour estimer l'impact des modifications apportées, le pouvoir inhibiteur des différents analogues a été évalué vis-à-vis de l'activité aminopeptidase N d'un lysat d'oocystes non sporulés.

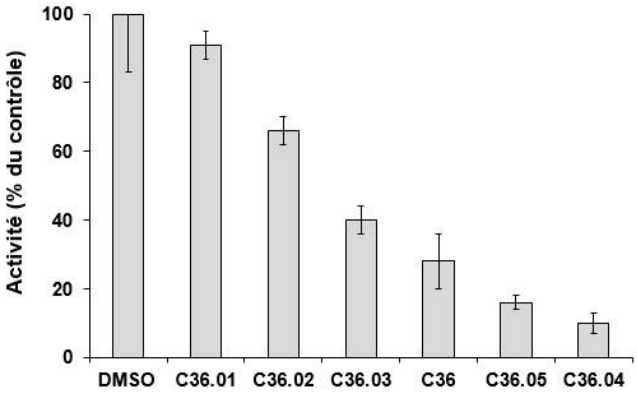


Figure 51 : Impact des pharmaco-modulations sur l'effet inhibiteur du C36

Les différents analogues obtenus ont été testés à 50 µM vis-à-vis de l'activité aminopeptidase N d'un lysat d'oocystes non sporulés. On distingue deux groupes : les composés possédant une meilleure inhibition que le C36 (C36.04 et C36.05) et ceux ayant une inhibition plus faible ou égale à celle du C36 (C36.01, C36.02 et C36.03).

Les composés avec un gros groupement alcyne (C36.01, C36.02 et C36.03) sont moins efficaces que ceux avec des petits groupements (C36.04 et C36.05). Les C36.05 et C36.04 sont les seuls composés qui possèdent une activité inhibitrice supérieure à celle du C36 original (Figure 51). En revanche, la variation de position du groupement CO entre les positions 6 et 9 ne semble pas cruciale pour l'activité inhibitrice. Pour poursuivre l'étude, nous avons sélectionné 2 composés : les C36.04 et C36.05 qui ont une activité inhibitrice supérieure à celle du C36. Le C36.02 a également été sélectionné, son pouvoir inhibiteur est plus faible que le C36 et servira de contrôle négatif.

Composé	Log P	Log S	Mw	Druglikeness	Drug-Score
C36	4.55	-5.82	485.0	-18	0.22
C36.01	4.85	-4.78	351.0	0,59	0,46
C36.02	5.62	-5.03	345.0	-9.49	0,23
C36.03	6.32	-5.82	423.0	-2.1	0,15
C36.04	3.27	-3.57	319.0	0,18	0,61
C36.05	2.81	-3.44	305.0	0,02	0,37

Tableau 10 : Estimation des paramètres physico-chimiques des dérivés du C36

Estimation des différents paramètres physico-chimiques par le logiciel OSIRIS : LogP (estimation de l'hydrophylie ; doit être compris entre 0 et 5), LogS (estimation de la solubilité, doit être supérieur à -4), Mw (estimation du poids moléculaire), Druglikeness (évaluation du potentiel en tant que drogue, doit être supérieur à 0) et le Drug-Score (estimation du potentiel global de la molécule en tant que drogue, doit être le plus grand possible) en fonction de la structure.

Avant de commencer les tests *in vitro*, la solubilité des analogues a été comparée à celle du C36 d'abord par une estimation informatique (Table 10) puis par un test *in vitro* sur HFF (Figure 52). Le composé C36 ne possède pas une très bonne solubilité et à forte concentration, le C36 forme des cristaux dans le milieu de culture. Ceci altère son efficacité et n'est pas compatible avec une utilisation en tant que drogue.

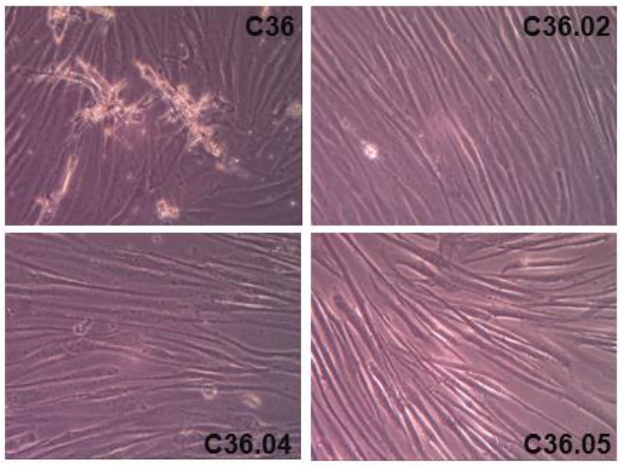


Figure 52 : Solubilité des composés

Photographies de microscopie photonique de cultures de HFF en présence de 50 µM de C36 et des dérivés C36.02, C36.04 et C36.05. La présence de cristaux pour le C36 est nettement observée; cristaux qui ne sont pas retrouvés pour les trois dérivés testés, indiquant un gain de solubilité au cours de la pharmaco-modulation.

La suppression des groupements ester et alcyne lors des pharmaco-modulations a visiblement amélioré la solubilité des composés. Les estimations de logS des composés C36.02, C36.04 et C36.05 sont meilleures que celle du C36. Ces estimations sont confortées par l'absence de formation de cristaux à 50 µM pour les 3 dérivés. Les analogues étant plus solubles, ceux-ci devraient être plus efficaces que le C36, car l'augmentation de la solubilité permet une meilleure absorption et distribution des composés dans les cellules et le parasite. Cette hypothèse a été confirmée lors des tests d'invasion et de développement avec les analogues (Figure 53).

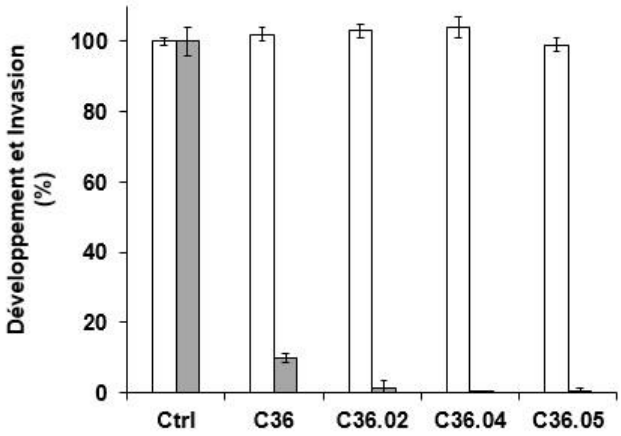


Figure 53 : Effets *in vitro* des dérivés du C36 sur le développement d'*E. tenella*

Comme pour le C36, les dérivés issus de la pharmaco-modulation ont été testés sur l'invasion et le développement d'*E. tenella* sur des cellules MDBK et comparé à un contrôle avec du solvant seulement (DMSO). L'invasion (blanc) et le développement (gris) sont exprimés en % du contrôle.

Comme observé avec le C36, Les trois dérivés testés entrainent une inhibition du développement sans modification significative de l'invasion. Les composés C36.04 et C36.05

ont montré une inhibition du développement *in vitro* plus importante que le C36. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus sur l'inhibition de l'activité des aminopeptidases N: les composés C36.04 et C36.05 se sont révélés plus efficaces que le C36. Cette observation nous permet donc de pouvoir corréler les effets observés au fluorimètre et ceux *in vitro* permettant d'obtenir une méthode rapide pour une première sélection des futurs dérivés. Il est important de noter que même le C36.02, qui est moins actif que le C36 pour inhiber l'activité aminopeptidase N au fluorimètre, inhibe plus fortement le développement d'*E. tenella* que le C36 ; illustrant l'importance de la bonne solubilité des composés.

d. Discussion et conclusion

Dans le but d'identifier des inhibiteurs des aminopeptidases N d'*E. tenella*, nous avons sélectionné comme cible la métallo-protéase identifiée et caractérisée comme une cible thérapeutique potentielle au cours de ma thèse, *Et*-ApN1. L'ensemble des travaux sur cet inhibiteur a suivi une logique de « Hit to Lead » (Keseru 2006), c'est une sélection des composés sans *a priori* qui, une fois validée par les expériences, permet de dessiner au fur et à mesure la structure d'un composé dit « chef de file » (Flipo, Florent *et al.* 2003; Flipo, Beghyn *et al.* 2007; Velmourougane, Harbut *et al.* 2011). Dans notre cas le composé chef de file, sera un composé efficace à faible concentration *in vitro* et *in vivo*, que l'on pourra pharmaco-moduler afin d'en faire une drogue spécifique et utilisable dans les élevages. Pour ce faire, le composé doit déjà posséder des paramètres de solubilité suffisants pour pouvoir être administré aux animaux dans une solution autre que son solvant.

Sur les 50 composés initiaux, seul le composé C36 a rempli les critères de sélection (Figures 43 à 46). Ce composé présente une très bonne inhibition de l'activité aminopeptidase N, un fort pouvoir inhibiteur du développement d'*E. tenella* (Figure 47). De plus, ses propriétés inhibitrices sont conservées pour d'autres parasites apicomplexes : *T. gondii* et *P. falciparum* (Figures 48 et 49). Cependant, le premier « hit », le composé C36, bien que très intéressant possède de nombreux inconvénients pour son utilisation en tant que drogue (Di and Kerns 2006) : sa synthèse est longue et présente un faible rendement, le composé est peu soluble entrainant la formation de cristaux et son IC_{50}, comprise entre 1 et 15 µM pour les 3 parasites apicomplexes testés, reste relativement élevée. Dans le but d'améliorer ces caractéristiques, nous avons commencé les pharmaco-modulations en nous intéressant à deux

groupes : le dérivé d'alcyne ajouté lors de la cyclisation et le groupement CO en position 9 (Figure 50).

Le deuxième « hit » a été réalisé avec les composés C36.04 et C36.05 (Figure 50 à 53) révélant qu'un composé chef de file avec de petits groupements alcynes greffés sera plus efficace qu'un composé avec de gros groupements. En effet, leur efficacité contre les *Et*-ApN et leur solubilité sont supérieures à celles du C36. Les groupements ester et les triples liaisons sont à éviter pour obtenir une meilleure solubilité du composé. La position du groupement CO ne fait pas varier de manière significative l'efficacité des composés indiquant que ce groupement n'est pas crucial. La recherche d'autres « hits » sera à réaliser afin de définir plus précisément la structure du composé chef de file afin de pouvoir produire une molécule soluble, efficace contre tous les apicomplexes sensibles au C36 (*E. tenella*, *T. gondii* et *P. falciparum*) à une dose inhibitrice de l'ordre du nano-molaire, le plus important restant l'efficacité du composé *in vivo*. Différentes pistes de pharmaco-modulation sont actuellement étudiées, comme la nature des cycles et l'espacement entre ceux-ci. Des études plus poussées seront à réaliser pour les futures modulations du C36 notamment en matière d'IC50 et de cytotoxicité. Les futurs travaux s'appuieront sur la modélisation 3D de l'interaction entre *Et*-ApN1 de le composé C36 pour définir les meilleures pharmaco-modulations théoriques pour renforcer l'interaction entre le composé et sa cible (Kalyaanamoorthy and Chen 2011).

L'ensemble de ces travaux pourrait conduire à la mise au point d'une nouvelle génération de drogue anticoccidienne ; voire d'un nouveau traitement contre d'autres apicomplexes chez qui l'apparition de résistances aux traitements actuels est de plus en plus forte (Mita and Tanabe 2012). La durée des pharmaco-modulations variera en fonction de l'objectif qui sera fixé : développer une sonde *in vitro*, un inhibiteur biochimique ou un traitement anticoccidien... L'obtention d'une molécule à effet anticoccidien utilisable en tant que traitement dans les élevages pourrait prendre plusieurs dizaines années (Kraljevic, Stambrook *et al.* 2004; PhRMA 2007).

Discussion générale et perspectives

La coccidiose aviaire est l'une des plus importantes maladies parasitaires touchant l'industrie avicole. Pour pallier les problèmes du coût élevé des vaccins et de l'apparition de résistances aux anticoccidiens, il est nécessaire de mieux connaitre les mécanismes moléculaires impliqués dans les étapes clefs du cycle des *Eimeria spp.*, parasites responsables de cette maladie. L'équipe Pathogenèse des Coccidioses s'intéresse aux facteurs de pathogénicité du parasite apicomplexe *E. tenella* et aux interactions hôte-pathogène du modèle poulet-*E. tenella*. Dans de nombreuses espèces parasitaires (*Plasmodium spp., Trypanosoma spp., Leishmania spp.*), il a été démontré que les protéases jouent un rôle important dans différents processus parasitaires comme l'invasion, le métabolisme, le développement, et l'immuno-modulation (Klemba and Goldberg 2002). Du fait de leurs rôles clefs dans le cycle biologique du parasite, les protéases sont considérées comme des facteurs de pathogénicité (Spaccapelo, Janse *et al.* 2010; Alvarez, Niemirowicz *et al.* 2012; Silva-Almeida, Pereira *et al.* 2012). Des homologues des différentes grandes familles de protéases sont présents chez *E. tenella.* En effet, des études ont mis en évidence la présence de protéases à cystéine (Rieux, Gras *et al.* 2012), à sérine (Fetterer, Miska *et al.* 2007) et de métallo-protéases (Fetterer, Miska *et al.* 2005) actives chez *E. tenella*. Cependant, les mécanismes moléculaires et/ou métaboliques dans lesquels interviennent ces protéases chez *E. tenella* sont peu documentés. Au cours de cette thèse, nous avons étudié l'implication des protéases au cours du cycle biologique d'*E. tenella*.

Le pouvoir pathogène d'*E. tenella* provient de sa multiplication intensive dans les cellules épithéliales des caeca des poulets. Nous avons donc choisi de nous intéresser aux protéases qui pourraient être impliquées dans le développement parasitaire. Chez *P. falciparum*, *Pf*A-M1, une métallo-protéase de la famille M1 de type aminopeptidase N, est impliquée dans le métabolisme et le développement du parasite (Florent, Derhy *et al.* 1998; Allary, Schrevel *et al.* 2002; Azimzadeh, Sow *et al.* 2010; Ragheb, Dalal *et al.* 2011). Des travaux antérieurs décrivent l'expression d'homologues de cette famille de protéases chez *E. tenella*, *Et*-ApN1 et *Et*-ApN2 (Fetterer, Miska *et al.* 2005; Katrib, Ikin *et al.* 2012). Nous nous sommes donc spécifiquement intéressés à ces deux aminopeptidases N. Nous avons débuté notre étude par l'évaluation des effets d'un inhibiteur d'aminopeptidases, la bestatine, sur le développement du parasite. Comme observé pour *P. falciparum*, l'addition de bestatine à des cultures cellulaires infectées par *E. tenella* entraîne un arrêt du développement. Cette expérience nous a confirmé que des aminopeptidases homologues à celle de *P. falciparum* sont impliquées

dans le développement d'*E. tenella*. Dans le but de caractériser *Et*-ApN1 et *Et*-ApN2, nous avons choisi de travailler à partir des oocystes, dans lesquels ces aminopeptidases ont initialement été détectées par (Fetterer, Miska *et al.* 2005). Pour identifier les protéases responsables de l'activité, un enrichissement de la fraction active vis-à-vis du substrat H-Ala-AMC a été effectué en collaboration avec Florence Gilbert (INRA, UMR1282, Infectiologie et Santé Publique, F-37380 Nouzilly, France). Les analyses de spectrométrie de masse ont révélé qu'une seule des deux aminopeptidases N prédites était active : *Et*-ApN1. Les analyses phylogénétiques réalisées ont révélé de fortes similitudes entre les séquences d'*Et*-ApN1 et de *Pf*A-M1 (85 % d'identité au niveau du site de fixation du zinc). Cette étude phylogénétique a été complétée par la modélisation de la structure d'*Et*-ApN1 en collaboration avec Sheena McGowan (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Monash University, Clayton, Victoria, Australia). La comparaison des structures de *Pf*A-M1 et d'*Et*-ApN1 a mis en évidence une organisation tridimensionnelle homologue entre les deux protéases. Nous avons donc émis l'hypothèse que *Pf*A-M1 et *Et*-ApN1 pouvaient avoir des paramètres biochimiques similaires. Des expériences de mesure de l'activité des protéines recombinantes vis-à-vis d'une banque de substrats ont montré que la préférence en substrats et les paramètres cinétiques de *Pf*A-M1 et d'*Et*-ApN1 sont très proches. L'homologie entre les deux aminopeptidases N est également retrouvée au niveau du profil de clivage (120, 96, 68 et 35 kDa et 120, 96, 68 et 38 kDa pour *Pf*A-M1 et *Et*-ApN1, respectivement) et de la localisation nucléaire. L'ensemble des données obtenues sur *Et*-ApN1 suggère que, comme *Pf*A-M1, cette protéase est impliquée dans le développement parasitaire et qu'elle est une cible thérapeutique potentielle. Nous n'avons cependant pas directement établi le rapport entre *Et*-ApN1 et le développement d'*E. tenella*.

La preuve directe d'une telle implication reposerait sur la production d'une souche invalidée pour ce gène (souche knock-out, KO) ou sur la mise en œuvre de RNAi, mais ces techniques ne sont pas encore disponibles pour le modèle *Eimeria*. Une alternative à cette difficulté est la production d'un inhibiteur spécifique d'*Et*-ApN1 (Harbut, Velmourougane *et al.* 2011) ; cependant l'obtention d'un tel inhibiteur est aléatoire et peut prendre plusieurs années. Une autre solution serait de réaliser une double recombinaison homologue, ce qui est possible grâce à la faisabilité de réaliser des KO chez *Toxoplasma*. Cette technique permettrait non seulement de prouver l'implication directe d'*Et*-ApN1 dans le développement mais également la conservation de fonctions entre les aminopeptidases N d'*E. tenella* et de *T. gondii*. La technique consiste à réaliser une complémentation de parasites *T. gondii*

Tg-ApN KO avec *Et*-ApN1 (Huynh, Opitz *et al.* 2004). De tels travaux nécessitent la construction d'une souche *T. gondii* KO inductible pour une ou plusieurs *Tg*-ApN complémentée avec *Et*-ApN1, la production des protéines recombinantes *Tg*-ApN1$_r$, *Tg*-ApN2$_r$ et *Tg*-ApN3$_r$, et la production des anticorps contre ces trois protéines. Ce travail permettra en plus de réaliser une comparaison entre *Et*-ApN1 et les *Tg*-ApN.

Après avoir confirmé l'implication d'*Et*-ApN1 dans le développement du parasite, il sera important de mieux décrypter les mécanismes moléculaires dans lesquels intervient *Et*-ApN1 ; pour cela, il sera nécessaire d'identifier les substrats de cette aminopeptidase ainsi que les mécanismes moléculaires qui en résultent. Dans un premier temps, des expériences de co-immunoprécipitation des partenaires d'*Et*-ApN1 dans la phase exogène (sporulation) et leur identification par spectrométrie de masse seront effectuées. Dans un second temps, l'identification des partenaires d'*Et*-ApN1 dans la phase intracellulaire et plus particulièrement à 16 h, lorsqu'*Et*-ApN1 est localisée dans le noyau du parasite, sera aussi réalisée. Pour ce faire, des parasites ayant envahi des cellules depuis 16 h seront isolés par microdissection laser suivi d'un enrichissement de la fraction nucléaire et d'une identification des partenaires par immunoprécipitation et analyse par spectrométrie de masse (Matsubayashi, Hatta *et al.* 2012). Une vérification par immunoprécipitation inversée des différents partenaires identifiés permettra de confirmer les résultats obtenus (Periz, Gill *et al.* 2007). La co-localisation d'*Et*-ApN1 avec les partenaires identifiés sera réalisée au cours du développement, et ce, par l'utilisation d'anticorps spécifiques ou l'expression de protéines taggées ou fusionnées avec des marqueurs fluorescents (Rieux, Gras *et al.* 2012).

Enfin, l'étude de la structure primaire d'*Et*-ApN1 sera réalisée. L'évaluation de l'importance de certains acides aminés ou motifs, pour le clivage et l'activité de la protéase, sera effectuée par mutagénèse dirigée sur la protéine recombinante. Pour l'étude du clivage, il a été postulé que chez *P. falciparum,* la leucine 796 de *Pf*A-M1 serait le site de clivage de la forme de 96 kDa, libérant les formes de 68 et 35 kDa (Azimzadeh, Sow *et al.* 2010; Ragheb, Dalal *et al.* 2011). En ce qui concerne *Et*-ApN1, une leucine se trouve dans le même domaine en position 751, position proche de la leucine 796 de *Pf*A-M1. Cette leucine 751 est d'autant plus intéressante qu'un clivage à son niveau conduirait à la formation d'un peptide de 38 kDa, ce qui serait cohérent avec les données que nous avons obtenues et qui ont permis de mettre en évidence des formes de clivage de 96, 68 et 38 kDa. Lors de l'étude de la structure primaire, il sera également intéressant de regarder les acides aminés importants pour l'activité. Les cibles d'intérêt pour étudier l'activité aminopeptidase d'*Et*-ApN1 sont les

domaines GAMEN et HExxHx$_{18}$E (Ashmun, Shapiro *et al.* 1992; Luciani, Marie-Claire *et al.* 1998).

Cette étude des domaines GAMEN et HExxHx$_{18}$E est d'autant plus intéressante que la séquence prédite de la deuxième aminopeptidase N, *Et*-ApN2, ne les possèdent pas et qu'ils sont indispensables à l'activité (Ashmun, Shapiro *et al.* 1992; Luciani, Marie-Claire *et al.* 1998). Aucune amplification d'*Et*-ApN2 n'a été obtenue par RT-PCR au cours du cycle biologique d'*E. tenella*. Ces résultats suggèrent que *Et*-ApN2 n'est ni transcrite, ni active. En revanche, nous avons mis en évidence l'existence d'une troisième aminopeptidase N, *Et*-ApN3 qui possède ces deux domaines GAMEN et HExxHx$_{18}$E. La séquence d'*Et*-ApN3 est située sur 3 contigs indépendants possédant des pourcentages d'identité importants avec 3 parties distinctes d'*Et*-ApN1 (65, 49 et 51 % d'identité avec *Et*-ApN1 pour ETH_0004935, ETH_00033545 et ETH_38820, respectivement). L'appartenance de ces trois contigs à un seul et même gène a été vérifiée par PCR. Les analyses phylogénétiques réalisées à partir de la séquence d'*Et*-ApN3 ont mis en évidence l'existence d'une homologie plus importante avec *Pf*A-M1 qu'avec *Et*-ApN1 (93 et 89 % d'identité au niveau du site de fixation du zinc avec *Pf*A-M1 et *Et*-ApN1, respectivement). De plus, *Et*-ApN3 a été identifiée comme la protéase responsable de l'activité dans les mérozoïtes, un stade où *Et*-ApN1 n'est pas exprimée. Nous avons aussi observé une différence de localisation entre *Et*-ApN1 et *Et*-ApN3 pendant le développement. *Et*-ApN3 a été retrouvée au niveau du pôle apical alors qu'*Et*-ApN1 a été localisée dans le cytoplasme et le noyau. L'ensemble de ces résultats suggère que les deux aminopeptidases N ont des fonctions complémentaires. L'étude de cette troisième aminopeptidase *Et*-ApN3 a cependant été confrontée à des problèmes de clonage. En effet, seule une séquence partielle d'*Et*-ApN3 a pu être obtenue. L'insolubilité de la protéine recombinante obtenue à partir de cette séquence ne nous a pas permis d'approfondir l'étude d'*Et*-ApN3 autant que celle d'*Et*-ApN1.

Parmi les perspectives de recherche concernant *Et*-ApN3, la priorité est l'obtention de la séquence complète. Une collaboration avec Adam Reid et Damer Blake permettra de bénéficier de leur expertise dans le séquençage d'*E. tenella* pour obtenir la totalité de la séquence d'*Et*-ApN3 (Reid, Blake *et al.* 2010). En effet, la structure du gène d'*Et*-ApN3 (3 contigs indépendants non associés avec un chromosome) rend l'obtention de la séquence complète délicate en raison de l'absence des extrémités 5' et 3'.

Une fois la protéine complète obtenue, la caractérisation de ses paramètres biochimiques pourra être réalisée et comparée à celle d'*Et*-ApN1. Des études sur les implications d'*Et*-ApN3 dans le cycle d'*E. tenella* seront réalisées. Dans un premier temps, l'attention sera portée sur les stades précoces de développement intracellulaire (4-16 h) pendant lesquels *Et*-ApN3 est localisée au niveau du pôle apical. Dans un deuxième temps, l'implication d'*Et*-ApN3 dans les mérozoïtes de 2ème génération sera également étudiée par une évaluation des effets d'inhibiteurs d'aminopeptidases (la bestatine et/ou le C36) sur la maturation des mérozoïtes et pour la transition du stade mérozoïtes au stade gamontes.

Comme pour *Et*-ApN1, les expériences de mutagénèse, d'identification des partenaires, de localisation et de complémentation en système hétérologue seront réalisées. La synthèse d'inhibiteurs spécifiques d'*Et*-ApN3 et d'*Et*-ApN1 permettra d'étudier leurs parts respectives dans l'activité détectée pendant la sporulation et le processus de développement (Harbut, Velmourougane *et al.* 2011). Ces projets sur *Et*-ApN1 et *Et*-ApN3 permettront de mieux comprendre la biologie des *Eimeria* et notamment l'implication de ces protéases dans les étapes clefs du cycle parasitaire (sporulation et étapes précoces du développement).

Parallèlement à ces aspects fondamentaux, les travaux portant sur *Et*-ApN1 et *Et*-ApN3 s'inscrivent également dans un contexte plus finalisé d'identification de cibles thérapeutiques pour répondre aux besoins de nouveaux traitements contre la coccidiose. Le choix des métallo-protéases et plus particulièrement des aminopeptidases N, était également motivé par le fait que les métallo-protéases font partie des familles les plus ciblées par les inhibiteurs de protéases commercialisés dans le cadre de traitement de maladies humaines telles que l'hypertension (Abbenante and Fairlie 2005). Dans la mesure où *Pf*A-M1 a été décrite comme cible thérapeutique potentielle (Flipo, Florent *et al.* 2003; McGowan, Porter *et al.* 2009; Harbut, Velmourougane *et al.* 2011; Velmourougane, Harbut *et al.* 2011) et que nous avons montré l'existence de fortes homologies entre *Pf*A-M1 et *Et*-ApN1, nous avons émis l'hypothèse que les *Et*-ApN pourraient être des cibles thérapeutiques potentielles. Nous avons criblé une chimiothèque à la recherche de composés capables d'inhiber l'activité d'*Et*-ApN1 et d'*Et*-ApN3. Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'ensemble de l'équipe RICM de Cécile Enguehard-Gueiffier et Mohamed Abarbri (Université François-Rabelais, Tours, France). Un composé, le C36, a été identifié. Il inhibe la totalité de l'activité aminopeptidase d'un lysat d'oocystes en présence du substrat fluorescent H-Ala-AMC, indiquant qu'il agit aussi bien sur *Et*-ApN1, que sur *Et*-ApN3. De plus, l'interaction directe du C36 avec *Et*-

ApN1 a également été mise en évidence par l'effet inhibiteur du C36 sur l'activité de la protéine recombinante. Les tests *in vitro* ont démontré que le C36 était un inhibiteur du développement d'*E. tenella*. L'inhibition *in vitro* du développement par le C36 est conservée chez 2 apicomplexes : *T. gondii* et *P. falciparum*. Sur la base de ces données, nous avons émis l'hypothèse que le C36 inhiberait le développement d'*E. tenella* en bloquant directement les *Et*-ApN. Cependant, nous ne possédons pas de preuve formelle indiquant que l'inhibition du développement par le C36 est liée à l'inhibition d'*Et*-ApN1 et/ou *Et*-ApN3. Le C36 pourrait notamment inhiber le développement par l'interaction avec d'autres protéases (parasitaires ou cellulaires). Seule la conservation des effets inhibiteurs du C36 chez *P. falciparum* suggère que cet effet est lié à une inhibition parasitaire et non cellulaire, les érythrocytes ne possédant pas de noyau.

L'actuelle réversibilité du composé rend difficile la validation de sa spécificité par co-précipitation (Arastu-Kapur, Ponder *et al.* 2008). La suite des travaux concernant le composé C36 pharmaco-modulé, visera donc à produire un inhibiteur irréversible ou un inhibiteur avec une très forte affinité pour les aminopeptidases N parasitaires (Flipo, Beghyn *et al.* 2007). L'obtention d'un tel composé doit être une priorité afin d'avancer conjointement sur la compréhension du cycle parasitaire et sur la synthèse de molécules à visée thérapeutique. Grâce à un composé C36 pharmaco-modulé irréversible, nous pourrons déterminer si le C36 entraîne une inhibition uniquement par son interaction avec les aminopeptidases N parasitaires (Chen, Xie *et al.* 2009). Ainsi, nous confirmerons à la fois l'implication d'*Et*-ApN1/*Et*-ApN3 dans le développement d'*E. tenella* mais également la validité des aminopeptidases N d'*E. tenella* comme cibles thérapeutiques (Azimzadeh, Sow *et al.* 2010; Jones, Robinson *et al.* 2011; Ragheb, Dalal *et al.* 2011). Pour le moment, l'ensemble des travaux sur le C36 a été réalisé *in vitro*. La pharmaco-modulation du composé C36 est nécessaire pour permettre au C36 de répondre à des critères spécifiques de solubilité, d'assimilation, de stabilité et d'index thérapeutique (Di and Kerns 2006). Une fois la solubilité du C36 améliorée, une évaluation de son efficacité *in vitro* puis *in vivo* (*per os* en condition expérimentale) sera réalisée. Si cette première série de tests *in vivo* est concluante, de nouveaux tests avec l'ajout du C36 dans l'eau de boisson ou la nourriture seront effectués (Chen, Brinen *et al.* 2010).

En outre, ces travaux pourraient servir à la production d'une nouvelle génération de drogues anticoccidiennes dont la cible thérapeutique est connue. Dans la mesure où un brevet a été déposé pour valoriser l'étude du C36, ce composé pourrait constituer une base pour la

synthèse d'un produit anticoccidien. L'utilisation de dérivés du C36, comme inhibiteur du développement parasitaire, pourrait permettre de lutter contre les souches d'*Eimeria* résistantes aux anticoccidiens, et présenterait l'avantage d'être utilisé seulement pendant les premières semaines de vie des animaux. En effet, le C36 est un inhibiteur du développement, et n'inhibe pas l'invasion. Il permettrait donc l'invasion des parasites sans autoriser la phase de multiplication. L'invasion des parasites permet la mise en place d'une réponse immunitaire qui protège les animaux de manière durable. En diminuant le temps d'utilisation du composé, la surexposition des parasites au composé est réduite, limitant l'apparition de résistance. Enfin, si les études futures démontrent qu'*Et*-ApN3 et *Et*-ApN1 possèdent deux fonctions différentes, le C36, qui inhibe les deux protéases, pourrait agir sur deux processus distincts. L'acquisition de la résistance pourrait donc être plus difficile car deux mécanismes d'inhibition devront être contournés pour acquérir la résistance (McKerrow, Engel *et al.* 1999).

L'ensemble des résultats obtenu permet d'émettre l'hypothèse que les cibles thérapeutiques identifiées chez *P. falciparum* ont probablement des homologues chez *E. tenella*, avec un potentiel en tant que cible thérapeutique contre la coccidiose. Dans le but de vérifier cette hypothèse et de mieux comprendre l'implication des autres métallo-protéases dans le cycle biologique d'*E. tenella* et notamment dans les étapes du développement intracellulaire, d'autres aminopeptidases pourraient également être étudiées. En effet, chez *P. falciparum*, en plus d'une alanyl-aminopeptidase (Florent, Derhy *et al.* 1998), quatre méthionine-aminopeptidases (Chen, Xie *et al.* 2009), deux prolyl-aminopeptidases (Ragheb, Bompiani *et al.* 2009), une leucine-aminopeptidase (McGowan, Oellig *et al.* 2010), ainsi qu'une aspartyl-aminopeptidase (Teuscher, Lowther *et al.* 2007) sont présentes. Chacune de ces familles de protéases possède un homologue prédit dans le génome d'*E. tenella* : méthionine-aminopeptidase (ETH_00020895 et ETH_00020890), leucine-aminopeptidase (ETH_00012380), prolyl-aminopeptidase (ETH_00029300), et aspartyl-aminopeptidase (ETH_00026985).

Parmi ces quatre candidates, la priorité sera donnée aux méthionine-aminopeptidases car elles sont sensibles aux techniques de dominants négatifs par inhibition compétitive (Klinkenberg, Ling *et al.* 1997; Vetro, Dummitt *et al.* 2005). Dans la mesure où l'insertion de gène (knock in, KI) est possible chez *Eimeria*, cette famille présente l'avantage de pouvoir être étudiée fonctionnellement par l'obtention d'un tel dominant négatif et ce, malgré

l'absence de KO. Cette technique repose sur la surexpression d'une protéase inactive qui se complexe avec les partenaires cellulaires et inhibe ainsi le complexe formé. Cette technique a été utilisée avec succès pour les méthionine-aminopeptidases de *Saccharomyces cerevisiae* (Klinkenberg, Ling *et al.* 1997; Vetro, Dummitt *et al.* 2005). Ces travaux nécessiteront le séquençage des méthionine-aminopeptidases d'*E. tenella*, leur mutation et leur transfection dans des parasites. Une transfection avec une expression inductible, de type « destabilization domain/shield » (DD-FKBP) (Daher, Plattner *et al.* 2010), serait néanmoins préférable car l'inhibition totale des méthionine-aminopeptidases pourrait s'avérer délétère, comme cela a été observé chez la souris (Ma, Fung *et al.* 2011).

Conclusion

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'implication des aminopeptidases et plus particulièrement à l'implication d'*Et*-ApN1, une métallo-protéase de la famille M1, dans le cycle de vie d'*E. tenella*. Nous avons également évalué le potentiel de cette protéase comme cible thérapeutique dans le cadre de la lutte contre la coccidiose.

Nous avons mis en évidence une très forte homologie entre *Et*-ApN1 et *Pf*A-M1, son homologue chez *P. falciparum*. Nous avons révélé que les deux aminopeptidases possèdent non seulement des homologies de séquence et de structure mais également des homologies de préférences en acides aminés en positon P1 du substrat, de paramètres cinétiques, de profil de maturation ainsi que de localisation. De plus, le traitement de cellules MDBK infectées par *E. tenella* par un inhibiteur de protéases (la bestatine), entraîne un arrêt du développement des parasites. L'ensemble de ces données conforte l'hypothèse d'une implication d'*Et*-ApN1 dans le développement et qu'elle pourrait, comme *Pf*A-M1, être une cible thérapeutique potentielle. Ces travaux ont cependant été limités par l'absence de technique de KO ou RNAi dans le modèle *Eimeria*, nous empêchant d'identifier spécifiquement la fonction d'*Et*-ApN1 dans le développement. Nous avons donc choisi d'utiliser une approche utilisant un inhibiteur spécifique pour contourner ce problème. Ces travaux sont en cours de réalisation en collaboration avec l'équipe Recherche et Innovation en Chimie Médicinale (RICM).

Nous avons également démontré l'existence d'une troisième aminopeptidase, *Et*-ApN3. Celle-ci est présente sous la forme de trois contigs isolés dans génome d'*E. tenella*, qui appartiennent à un seul et même gène. Les analyses préliminaires ont montré une similitude de séquences au niveau du site de fixation du zinc entre *Et*-ApN3 et *Pf*A-M1 (93 %), cette similitude est plus élevée qu'entre *Et*-ApN1 et *Pf*A-M1 (85 %). L'existence d'une troisième aminopeptidase N rapproche *E. tenella* de *T. gondii* qui possède également trois aminopeptidases N. Les perspectives viseront à identifier les partenaires d'*Et*-ApN1 et d'*Et*-ApN3 ainsi que les mécanismes moléculaires dans lesquels elles interviennent.

Un autre résultat important de cette thèse est l'identification du composé C36, un inhibiteur d'aminopeptidase N, ayant une structure inédite, inhibant *Et*-ApN1 et *Et*-ApN3, et qui induit l'arrêt du développement d'*E. tenella in vitro*. Les premières étapes de pharmaco-modulation ont permis d'améliorer la solubilité de ce composé. Cependant, cet inhibiteur étant réversible, nous n'avons pas pu prouver que l'inhibition du développement est directement liée à l'interaction du composé C36 avec les aminopeptidases N parasitaires. Néanmoins, nous avons réussi à montrer que le C36 est également efficace contre le développement de *T. gondii* et *P. falciparum*, renforçant très fortement l'hypothèse de

l'inhibition des aminopeptidases N parasitaires. Des travaux sont actuellement en cours pour synthétiser, par pharmaco-modulation du C36, un inhibiteur plus soluble, plus spécifique et irréversible. L'efficacité de ce nouveau composé sera testée *in vitro* puis, si les résultats sont concluants, *in vivo.*

Pour conclure, ces travaux de thèse ont permis de mettre en avant l'importance des métallo-protéases dans le développement de parasite *E. tenella*. Ils illustrent la conservation de facteurs de pathogénicité entre différents parasites du phylum des apicomplexes. De plus, ils suggèrent que les aminopeptidases N sont des cibles thérapeutiques intéressantes dans le cadre de la lutte contre les maladies parasitaires.

Bibliographie

Abbenante, G. and D. P. Fairlie (2005). "Protease inhibitors in the clinic." Med Chem **1**(1): 71-104.

Abu-Dayyeh, I., K. Hassani, E. R. Westra, J. C. Mottram and M. Olivier (2010). "Comparative study of the ability of Leishmania mexicana promastigotes and amastigotes to alter macrophage signaling and functions." Infect Immun **78**(6): 2438-2445.

Addlagatta, A., L. Gay and B. W. Matthews (2008). "Structural basis for the unusual specificity of Escherichia coli aminopeptidase N." Biochemistry **47**(19): 5303-5311.

Adl, S. M., A. G. Simpson, C. E. Lane, J. Lukes, D. Bass, S. S. Bowser, M. W. Brown, F. Burki, M. Dunthorn, V. Hampl, A. Heiss, M. Hoppenrath, E. Lara, L. Le Gall, D. H. Lynn, H. McManus, E. A. Mitchell, S. E. Mozley-Stanridge, L. W. Parfrey, J. Pawlowski, S. Rueckert, R. S. Shadwick, C. L. Schoch, A. Smirnov and F. W. Spiegel (2012). "The revised classification of eukaryotes." J Eukaryot Microbiol **59**(5): 429-493.

Agarwal, S., M. K. Singh, S. Garg, C. E. Chitnis and S. Singh (2013). "Ca(2+) -mediated exocytosis of subtilisin-like protease 1: a key step in egress of Plasmodium falciparum merozoites." Cell Microbiol **15**(6): 910-921.

Aikawa, M. and T. T. Antonovych (1964). "Electron Microscopic Observations of Plasmodium Berghei and the Kupffer Cell in the Liver of Rats." J Parasitol **50**: 620-629.

Ajioka, J. W. (1997). "The protozoan phylum Apicomplexa." Methods. **13**(2): 79-80.

Alfonso, Y. and L. Monzote (2011). "HIV Protease Inhibitors: Effect on the Opportunistic Protozoan Parasites." Open Med Chem J **5**: 40-50.

Allary, M., J. Schrevel and I. Florent (2002). "Properties, stage-dependent expression and localization of Plasmodium falciparum M1 family zinc-aminopeptidase." Parasitology **125**(Pt 1): 1-10.

Alvarez, V. E., G. T. Niemirowicz and J. J. Cazzulo (2012). "The peptidases of Trypanosoma cruzi: digestive enzymes, virulence factors, and mediators of autophagy and programmed cell death." Biochim Biophys Acta **1**: 195-206.

Andrews, K. T., D. P. Fairlie, P. K. Madala, J. Ray, D. M. Wyatt, P. M. Hilton, L. A. Melville, L. Beattie, D. L. Gardiner, R. C. Reid, M. J. Stoermer, T. Skinner-Adams, C. Berry and J. S. McCarthy (2006). "Potencies of human immunodeficiency virus

protease inhibitors in vitro against Plasmodium falciparum and in vivo against murine malaria." Antimicrob Agents Chemother **50**(2): 639-648.

Arabkhazaeli, F., M. Modrisanei, S. Nabian, B. Mansoori and A. Madani (2013). "Evaluating the Resistance of Eimeria Spp. Field Isolates to Anticoccidial Drugs Using Three Different Indices." Iran J Parasitol. **8**(2): 234-241.

Arastu-Kapur, S., E. L. Ponder, U. P. Fonovic, S. Yeoh, F. Yuan, M. Fonovic, M. Grainger, C. I. Phillips, J. C. Powers and M. Bogyo (2008). "Identification of proteases that regulate erythrocyte rupture by the malaria parasite Plasmodium falciparum." Nat Chem Biol **4**(3): 203-213.

Ashmun, R. A., L. H. Shapiro and A. T. Look (1992). "Deletion of the zinc-binding motif of CD13/aminopeptidase N molecules results in loss of epitopes that mediate binding of inhibitory antibodies." Blood **79**(12): 3344-3349.

Atkinson, H. J., P. C. Babbitt and M. Sajid (2009). "The global cysteine peptidase landscape in parasites." Trends Parasitol **25**(12): 573-581.

Azimzadeh, O., C. Sow, M. Geze, J. Nyalwidhe and I. Florent (2010). "Plasmodium falciparum PfA-M1 aminopeptidase is trafficked via the parasitophorous vacuole and marginally delivered to the food vacuole." Malar J **9**: 189.

Bachaya, H. A., M. A. Raza, M. N. Khan, l. Z. Iqba, R. Z. Abbas, S. Murtaza and N. Badar (2012). "Predominance and detection of different eimeria species causing coccidiosis in layer chickens " The Journal of Animal & Plant Sciences **22**(3): 597-600.

Bafundo, K. W., H. M. Cervantes and G. F. Mathis (2008). "Sensitivity of Eimeria field isolates in the United States: responses of nicarbazin-containing anticoccidials." Poult Sci **87**(9): 1760-1767.

Barr, S. C., K. L. Warner, B. G. Kornreic, J. Piscitelli, A. Wolfe, L. Benet and J. H. McKerrow (2005). "A cysteine protease inhibitor protects dogs from cardiac damage during infection by Trypanosoma cruzi." Antimicrob Agents Chemother **49**(12): 5160-5161.

Belli, S. I., D. J. P. Ferguson, M. Katrib, I. Slapetova, K. Mai, J. Slapeta, S. A. Flowers, K. B. Miska, F. M. Tomley, M. W. Shirley, M. G. Wallach and N. C. Smith (2009). "Conservation of proteins involved in oocyst wall formation in Eimeria maxima, Eimeria tenella and Eimeria acervulina." International Journal for Parasitology **39**(10): 1063-1070.

Bernhard, S. A. (1969). Structure et fonction des enzymes.

Berthonneau, J., M. H. Rodier, B. El Moudni and J. L. Jacquemin (2000). "Toxoplasma gondii: purification and characterization of an immunogenic metallopeptidase." Exp Parasitol **95**(2): 158-162.

Bogdan, C. and M. Rollinghoff (1998). "The immune response to Leishmania: mechanisms of parasite control and evasion." Int J Parasitol **28**(1): 121-134.

Boulard, C. and A. Lecroisey (1982). "Specific antisera produced by direct immunization with slices of polyacrylamide gel containing small amounts of protein." J Immunol Methods **50**(2): 221-226.

Brittingham, A., C. J. Morrison, W. R. McMaster, B. S. McGwire, K. P. Chang and D. M. Mosser (1995). "Role of the Leishmania surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis." J Immunol **155**(6): 3102-3111.

Brown, P. J., K. J. Billington, J. M. Bumstead, J. D. Clark and F. M. Tomley (2000). "A microneme protein from Eimeria tenella with homology to the Apple domains of coagulation factor XI and plasma pre-kallikrein." Molecular and Biochemical Parasitology **107**(1): 91-102.

Brueggemeier, U. G., A.; Golz, S. (2004). "Diagnostic et traitement de maladies associees a l'aminopeptidase n (anpep)." from http://www.google.com/patents/WO2005114207A2?cl=fr.

Brunger, A. T., P. D. Adams, G. M. Clore, W. L. DeLano, P. Gros, R. W. Grosse-Kunstleve, J. S. Jiang, J. Kuszewski, M. Nilges, N. S. Pannu, R. J. Read, L. M. Rice, T. Simonson and G. L. Warren (1998). "Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **54**(Pt 5): 905-921.

Buitrago-Rey, R., J. Olarte and J. E. Gomez-Marin (2002). "Evaluation of two inhibitors of invasion: LY311727 [3-(3-acetamide-1-benzyl-2-ethyl-indolyl-5-oxy)propane phosphonic acid] and AEBSF [4-(2-aminoethyl)-benzenesulphonyl fluoride] in acute murine toxoplasmosis." J Antimicrob Chemother **49**(5): 871-874.

Burt, S. A., M. H. Tersteeg-Zijderveld, B. G. Jongerius-Gortemaker, L. Vervelde and J. C. Vernooij (2013). "In vitro inhibition of Eimeria tenella invasion of epithelial cells by phytochemicals." Vet Parasitol **191**(3-4): 374-378.

Calas, M., G. Cordina, J. Bompart, M. Ben Bari, T. Jei, M. L. Ancelin and H. Vial (1997). "Antimalarial activity of molecules interfering with Plasmodium falciparum phospholipid metabolism. Structure-activity relationship analysis." J Med Chem **40**(22): 3557-3566.

Caldarelli, S. A., S. El Fangour, S. Wein, C. Tran van Ba, C. Perigaud, A. Pellet, H. J. Vial and S. Peyrottes (2013). "New bis-thiazolium analogues as potential antimalarial agents: design, synthesis, and biological evaluation." J Med Chem **56**(2): 496-509.

Caldarelli, S. A., M. Hamel, J. F. Duckert, M. Ouattara, M. Calas, M. Maynadier, S. Wein, C. Perigaud, A. Pellet, H. J. Vial and S. Peyrottes (2012). "Disulfide prodrugs of albitiazolium (T3/SAR97276): synthesis and biological activities." J Med Chem **55**(10): 4619-4628.

Castañón, C. A. B., J. S. Fraga, S. Fernandez, A. Gruber and L. da F. Costa (2007). "Biological shape characterization for automatic image recognition and diagnosis of protozoan parasites of the genus Eimeria." Pattern Recognition **40**(7): 1899-1910.

Cattelan, A. M., M. L. Calabro, S. M. Aversa, M. Zanchetta, F. Meneghetti, A. De Rossi and L. Chieco-Bianchi (1999). "Regression of AIDS-related Kaposi's sarcoma following antiretroviral therapy with protease inhibitors: biological correlates of clinical outcome." Eur J Cancer **35**(13): 1809-1815.

Cazzulo, J. J., M. C. Cazzulo Franke, J. Martinez and B. M. Franke de Cazzulo (1990). "Some kinetic properties of a cysteine proteinase (cruzipain) from Trypanosoma cruzi." Biochim Biophys Acta **9**(2): 186-191.

Cazzulo, J. J., R. Couso, A. Raimondi, C. Wernstedt and U. Hellman (1989). "Further characterization and partial amino acid sequence of a cysteine proteinase from Trypanosoma cruzi." Mol Biochem Parasitol **33**(1): 33-41.

Challey, J. R., T. K. Jeffers and W. H. McGibbon (1968). "The response of commercial egg production stocks to experimental infection with Eimeria tenella and its relation to field mortality." Poult Sci **47**(4): 1197-1204.

Chen, X., C. R. Chong, L. Shi, T. Yoshimoto, D. J. Sullivan, Jr. and J. O. Liu (2006). "Inhibitors of Plasmodium falciparum methionine aminopeptidase 1b possess antimalarial activity." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(39): 14548-14553.

Chen, X., S. Xie, S. Bhat, N. Kumar, T. A. Shapiro and J. O. Liu (2009). "Fumagillin and fumarranol interact with P. falciparum methionine aminopeptidase 2 and inhibit malaria parasite growth in vitro and in vivo." Chem Biol **16**(2): 193-202.

Chen, Y. T., L. S. Brinen, I. D. Kerr, E. Hansell, P. S. Doyle, J. H. McKerrow and W. R. Roush (2010). "In vitro and in vivo studies of the trypanocidal properties of WRR-483 against Trypanosoma cruzi." PLoS Negl Trop Dis **4**(9): 0000825.

Choy, J. W., C. Bryant, C. M. Calvet, P. S. Doyle, S. S. Gunatilleke, S. S. Leung, K. K. Ang, S. Chen, J. Gut, J. A. Oses-Prieto, J. B. Johnston, M. R. Arkin, A. L. Burlingame, J. Taunton, M. P. Jacobson, J. M. McKerrow, L. M. Podust and A. R. Renslo (2013). "Chemical-biological characterization of a cruzain inhibitor reveals a second target and a mammalian off-target." Beilstein J Org Chem **9**: 15-25.

CIBPvet. (2013). "Sulfamidés et triméthoprime ", from http://www.cbip-vet.be/fr/texts/FAMOOOL1HL2o.php.

Clark, I. A. and W. B. Cowden (2003). "The pathophysiology of falciparum malaria." Pharmacol Ther **99**(2): 221-260.

Conseil, V., M. Soete and J. F. Dubremetz (1999). "Serine protease inhibitors block invasion of host cells by Toxoplasma gondii." Antimicrob Agents Chemother **43**(6): 1358-1361.

Constam, D. B., A. R. Tobler, A. Rensing-Ehl, I. Kemler, L. B. Hersh and A. Fontana (1995). "Puromycin-sensitive aminopeptidase. Sequence analysis, expression, and functional characterization." J Biol Chem **270**(45): 26931-26939.

Contreras, I., M. A. Gomez, O. Nguyen, M. T. Shio, R. W. McMaster and M. Olivier (2010). "Leishmania-induced inactivation of the macrophage transcription factor AP-1 is mediated by the parasite metalloprotease GP63." PLoS Pathog **6**(10): 1001148.

Corpet, F. (1988). "Multiple sequence alignment with hierarchical clustering." Nucleic Acids Res **16**(22): 10881-10890.

Daher, W., F. Plattner, M. F. Carlier and D. Soldati-Favre (2010). "Concerted action of two formins in gliding motility and host cell invasion by Toxoplasma gondii." PLoS Pathog **6**(10): 1001132.

Dalal, S. and M. Klemba (2007). "Roles for two aminopeptidases in vacuolar hemoglobin catabolism in Plasmodium falciparum." J Biol Chem **282**(49): 35978-35987.

Danziger, R. S. (2008). "Aminopeptidase N in arterial hypertension." Heart Fail Rev **13**(3): 293-298.

De Souza Leao, S., T. Lang, E. Prina, R. Hellio and J. C. Antoine (1995). "Intracellular Leishmania amazonensis amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells." J Cell Sci **108**(Pt 10): 3219-3231.

de Venevelles, P., J. Francois Chich, W. Faigle, B. Lombard, D. Loew, P. Pery and M. Labbe (2006). "Study of proteins associated with the Eimeria tenella refractile body by a proteomic approach." Int J Parasitol **36**(13): 1399-1407.

Del Nery, E., M. A. Juliano, A. P. Lima, J. Scharfstein and L. Juliano (1997). "Kininogenase activity by the major cysteinyl proteinase (cruzipain) from Trypanosoma cruzi." J Biol Chem **272**(41): 25713-25718.

Demarchi, I. G., T. G. Silveira, I. C. Ferreira and M. V. Lonardoni (2012). "Effect of HIV protease inhibitors on New World Leishmania." Parasitol Int **61**(4): 538-544.

Dhawan, S., M. Dua, A. H. Chishti and M. Hanspal (2003). "Ankyrin peptide blocks falcipain-2-mediated malaria parasite release from red blood cells." J Biol Chem **278**(32): 30180-30186.

Di, L. and E. H. Kerns (2006). "Biological assay challenges from compound solubility: strategies for bioassay optimization." Drug Discov Today **11**(9-10): 446-451.

Dixon, M. (1953). "The determination of enzyme inhibitor constants." Biochem J **55**(1): 170-171.

Dixon, M. W., E. C. ; (1964). Enzymes, Longmans.

Dluzewski, A. R., K. Rangachari, R. J. Wilson and W. B. Gratzer (1986). "Plasmodium falciparum: protease inhibitors and inhibition of erythrocyte invasion." Exp Parasitol **62**(3): 416-422.

Donahue, C. G., V. B. Carruthers, S. D. Gilk and G. E. Ward (2000). "The Toxoplasma homolog of Plasmodium apical membrane antigen-1 (AMA-1) is a microneme protein secreted in response to elevated intracellular calcium levels." Mol Biochem Parasitol **111**(1): 15-30.

Doyle, P. S., Y. M. Zhou, I. Hsieh, D. C. Greenbaum, J. H. McKerrow and J. C. Engel (2011). "The Trypanosoma cruzi protease cruzain mediates immune evasion." PLoS Pathog **7**(9): 1.

Drag, M., M. Bogyo, J. A. Ellman and G. S. Salvesen (2010). "Aminopeptidase fingerprints, an integrated approach for identification of good substrates and optimal inhibitors." J Biol Chem **285**(5): 3310-3318.

Drag, M. and G. S. Salvesen (2010). "Emerging principles in protease-based drug discovery." Nat Rev Drug Discov **9**(9): 690-701.

Eksi, S., B. Czesny, D. C. Greenbaum, M. Bogyo and K. C. Williamson (2004). "Targeted disruption of Plasmodium falciparum cysteine protease, falcipain 1, reduces oocyst production, not erythrocytic stage growth." Mol Microbiol **53**(1): 243-250.

Eksi, S., B. Czesny, G. J. van Gemert, R. W. Sauerwein, W. Eling and K. C. Williamson (2007). "Inhibition of Plasmodium falciparum oocyst production by membrane-permeant cysteine protease inhibitor E64d." Antimicrob Agents Chemother **51**(3): 1064-1070.

Engel, J. C., P. S. Doyle, I. Hsieh and J. H. McKerrow (1998). "Cysteine protease inhibitors cure an experimental Trypanosoma cruzi infection." J Exp Med **188**(4): 725-734.

Engel, J. C., C. Torres, I. Hsieh, P. S. Doyle and J. H. McKerrow (2000). "Upregulation of the secretory pathway in cysteine protease inhibitor-resistant Trypanosoma cruzi." J Cell Sci **113**(Pt 8): 1345-1354.

Engels, K., C. Beyer, M. L. Suarez Fernandez, F. Bender, M. Gassel, G. Unden, R. J. Marhofer, J. C. Mottram and P. M. Selzer (2010). "Inhibition of Eimeria tenella CDK-related kinase 2: From target identification to lead compounds." ChemMedChem **5**(8): 1259-1271.

Eswar, N., B. Webb, M. A. Marti-Renom, M. S. Madhusudhan, D. Eramian, M. Y. Shen, U. Pieper and A. Sali (2006). "Comparative protein structure modeling using Modeller." Curr Protoc Bioinformatics **5**(5).

Fetterer, R. H., K. B. Miska and R. C. Barfield (2005). "Partial purification and characterization of an aminopeptidase from Eimeria tenella." J Parasitol **91**(6): 1280-1286.

Fetterer, R. H., K. B. Miska, H. Lillehoj and R. C. Barfield (2007). "Serine protease activity in developmental stages of Eimeria tenella." J Parasitol **93**(2): 333-340.

Flipo, M., T. Beghyn, V. Leroux, I. Florent, B. P. Deprez and R. F. Deprez-Poulain (2007). "Novel selective inhibitors of the zinc plasmodial aminopeptidase PfA-M1 as potential antimalarial agents." J Med Chem **50**(6): 1322-1334.

Flipo, M., I. Florent, P. Grellier, C. Sergheraert and R. Deprez-Poulain (2003). "Design, synthesis and antimalarial activity of novel, quinoline-based, zinc metallo-aminopeptidase inhibitors." Bioorg Med Chem Lett **13**(16): 2659-2662.

Florent, I., Z. Derhy, M. Allary, M. Monsigny, R. Mayer and J. Schrevel (1998). "A Plasmodium falciparum aminopeptidase gene belonging to the M1 family of zinc-

metallopeptidases is expressed in erythrocytic stages." Mol Biochem Parasitol **97**(1-2): 149-160.

Fontijn, D., M. C. Duyndam, M. P. van Berkel, Y. Yuana, L. H. Shapiro, H. M. Pinedo, H. J. Broxterman and E. Boven (2006). "CD13/Aminopeptidase N overexpression by basic fibroblast growth factor mediates enhanced invasiveness of 1F6 human melanoma cells." Br J Cancer **94**(11): 1627-1636.

FRAB (2012). Prophylaxie des Volailles en AB : médecines alternatives. Midi-Pyrénées.

Francis, S. E., I. Y. Gluzman, A. Oksman, A. Knickerbocker, R. Mueller, M. L. Bryant, D. R. Sherman, D. G. Russell and D. E. Goldberg (1994). "Molecular characterization and inhibition of a Plasmodium falciparum aspartic hemoglobinase." Embo J **13**(2): 306-317.

Fuscien, A.-L. (2012). Le Bulletin bio des agriculteurs de Lot-et-Garonne. L.-e.-G. (47), Jean MARBOUTIN. **29**.

Garcia-Rivera, G., M. A. Rodriguez, R. Ocadiz, M. C. Martinez-Lopez, R. Arroyo, A. Gonzalez-Robles and E. Orozco (1999). "Entamoeba histolytica : a novel cysteine protease and an adhesin form the 112 kDa surface protein." Mol Microbiol **33**(3): 556-568.

Gluzman, I. Y., S. E. Francis, A. Oksman, C. E. Smith, K. L. Duffin and D. E. Goldberg (1994). "Order and specificity of the Plasmodium falciparum hemoglobin degradation pathway." J Clin Invest **93**(4): 1602-1608.

Goldberg, D. E., A. F. Slater, R. Beavis, B. Chait, A. Cerami and G. B. Henderson (1991). "Hemoglobin degradation in the human malaria pathogen Plasmodium falciparum: a catabolic pathway initiated by a specific aspartic protease." J Exp Med **173**(4): 961-969.

Gomez, M. A., I. Contreras, M. Halle, M. L. Tremblay, R. W. McMaster and M. Olivier (2009). "Leishmania GP63 alters host signaling through cleavage-activated protein tyrosine phosphatases." Sci Signal **2**(90): 2000213.

Graat, E. A., A. M. Henken, H. W. Ploeger, J. P. Noordhuizen and M. H. Vertommen (1994). "Rate and course of sporulation of oocysts of Eimeria acervulina under different environmental conditions." Parasitology **108**(Pt 5): 497-502.

Greenbaum, D. C., A. Baruch, M. Grainger, Z. Bozdech, K. F. Medzihradszky, J. Engel, J. DeRisi, A. A. Holder and M. Bogyo (2002). "A role for the protease falcipain 1 in host cell invasion by the human malaria parasite." Science **298**(5600): 2002-2006.

Gregory, D. J., M. Godbout, I. Contreras, G. Forget and M. Olivier (2008). "A novel form of NF-kappaB is induced by Leishmania infection: involvement in macrophage gene expression." Eur J Immunol **38**(4): 1071-1081.

Hamet, N., P. Mérat, F. Bertrand and G. Coquerelle (1982). "Etude des particularités de la poule Fayoumi Il. - Résistance à la coccidiose (Eimeria tenella) des poussins Fayoumi, Rhode-Island et de leur croisement." Ann Genet Sel Anim. **14**(4): 453-462.

Harbut, M. B., G. Velmourougane, S. Dalal, G. Reiss, J. C. Whisstock, O. Onder, D. Brisson, S. McGowan, M. Klemba and D. C. Greenbaum (2011). "Bestatin-based chemical biology strategy reveals distinct roles for malaria M1- and M17-family aminopeptidases." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(34): 15.

Hartley, B. S. (1960). "Proteolytic enzymes." Annu Rev Biochem **29**: 45-72.

Heams, T., B. Bed'hom, E. Rebours, F. Jaffrezic and M. H. Pinard-van der Laan (2011). "Insights into gene expression profiling of natural resistance to coccidiosis in contrasting chicken lines." BMC Proc **3**(5): 1753-6561.

Hegde, K. S. and W. M. Reid (1969). "Effects of six single species of coccidia on egg production and culling rate of susceptibel layers." Poult Sci **48**(3): 928-932.

Hobbs, C. V., T. Q. Tanaka, O. Muratova, J. Van Vliet, W. Borkowsky, K. C. Williamson and P. E. Duffy (2013). "HIV treatments have malaria gametocyte killing and transmission blocking activity." J Infect Dis **208**(1): 139-148.

Hofmann, J. and W. Raether (1990). "Improved techniques for the in vitro cultivation of Eimeria tenella in primary chick kidney cells." Parasitol Res **76**(6): 479-486.

Hosein, F. N., A. Bandyopadhyay, W. A. Peer and A. S. Murphy (2010). "The catalytic and protein-protein interaction domains are required for APM1 function." Plant Physiol **152**(4): 2158-2172.

Huynh, M. H., C. Opitz, L. Y. Kwok, F. M. Tomley, V. B. Carruthers and D. Soldati (2004). "Trans-genera reconstitution and complementation of an adhesion complex in Toxoplasma gondii." Cell Microbiol **6**(8): 771-782.

Inack Ngi, S., V. Guilloteau, M. Abarbri and J. Thibonnet (2011). "Regioselective copper-mediated synthesis of thieno[2,3-c]pyrane-7-one, indolo[2,3-c]pyrane-1-one, and indolo[3,2-c]pyrane-1-one." J Org Chem **76**(20): 8347-8354.

Interchemie. (2013). "Intracox Oral." Toltrazuril, from http://www.interchemie.com/produits-veterinaires/coccidiostatiques/intracox-oral.html.

ITAB (2009). CAHIER TECHNIQUE: Produire du poulet de chair en AB.

Jeffers, T. K. (1975). "Attenuation of Eimeria tenella through selection for precociousness." J Parasitol **61**(6): 1083-1090.

Jia, H., Y. Nishikawa, Y. Luo, J. Yamagishi, C. Sugimoto and X. Xuan (2010). "Characterization of a leucine aminopeptidase from Toxoplasma gondii." Molecular and Biochemical Parasitology **170**(1): 1-6.

Jiang, L., J. Lin, H. Han, H. Dong, Q. Zhao, S. Zhu and B. Huang (2012). "Identification and characterization of Eimeria tenella apical membrane antigen-1 (AMA1)." PLoS One **7**(7): 19.

Jones, P. M., M. W. Robinson, J. P. Dalton and A. M. George (2011). "The Plasmodium falciparum malaria M1 alanyl aminopeptidase (PfA-M1): insights of catalytic mechanism and function from MD simulations." PLoS One **6**(12): 21.

Kalyaanamoorthy, S. and Y. P. Chen (2011). "Structure-based drug design to augment hit discovery." Drug Discov Today **16**(17-18): 831-839.

Kariya, R., M. Taura, S. Suzu, H. Kai, H. Katano and S. Okada (2013). "HIV protease inhibitor Lopinavir induces apoptosis of primary effusion lymphoma cells via suppression of NF-kappaB pathway." Cancer Lett **5**(13): 00642-00643.

Katrib, M., R. J. Ikin, F. Brossier, M. Robinson, I. Slapetova, P. A. Sharman, R. A. Walker, S. I. Belli, F. M. Tomley and N. C. Smith (2012). "Stage-specific expression of protease genes in the apicomplexan parasite, Eimeria tenella." BMC Genomics **13**(685): 1471-2164.

Kehlen, A., U. Lendeckel, H. Dralle, J. Langner and C. Hoang-Vu (2003). "Biological significance of aminopeptidase N/CD13 in thyroid carcinomas." Cancer Res **63**(23): 8500-8506.

Kerr, I. D., J. H. Lee, C. J. Farady, R. Marion, M. Rickert, M. Sajid, K. C. Pandey, C. R. Caffrey, J. Legac, E. Hansell, J. H. McKerrow, C. S. Craik, P. J. Rosenthal and L. S. Brinen (2009). "Vinyl sulfones as antiparasitic agents and a structural basis for drug design." J Biol Chem **284**(38): 25697-25703.

Keseru, G. M. M., G. M. (2006). "Hit discovery and hit-to-lead approaches." Drug Discov Today **11**: 741-748.

Kim, D. K., H. S. Lillehoj, S. H. Lee, S. I. Jang, E. P. Lillehoj and D. Bravo (2013). "Dietary Curcuma longa enhances resistance against Eimeria maxima and Eimeria tenella infections in chickens." Poult Sci **92**(10): 2635-2643.

Kim, H. M., N. Haraguchi, H. Ishii, M. Ohkuma, M. Okano, K. Mimori, H. Eguchi, H. Yamamoto, H. Nagano, M. Sekimoto, Y. Doki and M. Mori (2012). "Increased CD13 expression reduces reactive oxygen species, promoting survival of liver cancer stem cells via an epithelial-mesenchymal transition-like phenomenon." Ann Surg Oncol **19**(3): 011-2040.

Kipper, M., I. Andretta, C. R. Lehnen, P. A. Lovatto and S. G. Monteiro (2013). "Meta-analysis of the performance variation in broilers experimentally challenged by Eimeria spp." Veterinary Parasitology **196**: 77-84.

Kissinger, J. C., B. Gajria, L. Li, I. T. Paulsen and D. S. Roos (2003). "ToxoDB: accessing the Toxoplasma gondii genome." Nucleic Acids Res **31**(1): 234-236.

Kissinger, J. C., A. J. Milgram, M. J. Fraunholz, D. S. Roos, B. P. Brunk, J. Crabtree, S. J. Diskin, J. Schug, G. C. Overton, C. J. Stoeckert, R. L. Coppel, R. L. Huestis and C. Plasmodium Genome Database (2001). "PlasmoDB: An integrative database of the Plasmodium falciparum genome. Tools for accessing and analyzing finished and unfinished sequence data. The Plasmodium Genome Database Collaborative." Nucleic Acids Res **29**(1): 66-69.

Klemba, M., I. Gluzman and D. E. Goldberg (2004). "A Plasmodium falciparum dipeptidyl aminopeptidase I participates in vacuolar hemoglobin degradation." J Biol Chem **279**(41): 43000-43007.

Klemba, M. and D. E. Goldberg (2002). "Biological roles of proteases in parasitic protozoa." Annu Rev Biochem **71**: 275-305.

Klinkenberg, M., C. Ling and Y. H. Chang (1997). "A dominant negative mutation in Saccharomyces cerevisiae methionine aminopeptidase-1 affects catalysis and interferes with the function of methionine aminopeptidase-2." Arch Biochem Biophys **347**(2): 193-200.

Kocken, C. H., D. L. Narum, A. Massougbodji, B. Ayivi, M. A. Dubbeld, A. van der Wel, D. J. Conway, A. Sanni and A. W. Thomas (2000). "Molecular characterisation of Plasmodium reichenowi apical membrane antigen-1 (AMA-1), comparison with P. falciparum AMA-1, and antibody-mediated inhibition of red cell invasion." Mol Biochem Parasitol **109**(2): 147-156.

Kolakovich, K. A., I. Y. Gluzman, K. L. Duffin and D. E. Goldberg (1997). "Generation of hemoglobin peptides in the acidic digestive vacuole of Plasmodium falciparum

implicates peptide transport in amino acid production." Mol Biochem Parasitol **87**(2): 123-135.

Kraljevic, S., P. J. Stambrook and K. Pavelic (2004). "Accelerating drug discovery." EMBO Rep **5**(9): 837-842.

Kuo, C. H., J. P. Wares and J. C. Kissinger (2008). "The Apicomplexan whole-genome phylogeny: an analysis of incongruence among gene trees." Mol Biol Evol **25**(12): 2689-2698.

l'ITAVI, S. E. d. (2012). Situation de la production et des marchés avicoles. Web, ITAVI.

Labbé, M., M. Péroval, C. Bourdieu, F. Girard-Misguich and P. Péry (2006). "Eimeria tenella enolase and pyruvate kinase: A likely role in glycolysis and in others functions." International Journal for Parasitology **36**(14): 1443-1452.

Lal, K., E. Bromley, R. Oakes, J. H. Prieto, S. J. Sanderson, D. Kurian, L. Hunt, J. R. Yates, 3rd, J. M. Wastling, R. E. Sinden and F. M. Tomley (2009). "Proteomic comparison of four Eimeria tenella life-cycle stages: unsporulated oocyst, sporulated oocyst, sporozoite and second-generation merozoite." Proteomics **9**(19): 4566-4576.

Larrinaga, G., L. F. Callado, N. Agirregoitia, A. Varona and J. Gil (2005). "Subcellular distribution of membrane-bound aminopeptidases in the human and rat brain." Neuroscience Letters **383**(1–2): 136-140.

Larson, E. T., F. Parussini, M. H. Huynh, J. D. Giebel, A. M. Kelley, L. Zhang, M. Bogyo, E. A. Merritt and V. B. Carruthers (2009). "Toxoplasma gondii cathepsin L is the primary target of the invasion-inhibitory compound morpholinurea-leucyl-homophenyl-vinyl sulfone phenyl." J Biol Chem **284**(39): 26839-26850.

Le Bonniec, S., C. Deregnaucourt, V. Redeker, R. Banerjee, P. Grellier, D. E. Goldberg and J. Schrevel (1999). "Plasmepsin II, an acidic hemoglobinase from the Plasmodium falciparum food vacuole, is active at neutral pH on the host erythrocyte membrane skeleton." J Biol Chem **274**(20): 14218-14223.

Lee, H. A., S. Hong, Y. H. Chung, K. D. Song and O. Kim (2012). "Anticoccidial effects of Galla rhois extract on Eimeria tenella-infected chicken." Lab Anim Res **28**(3): 193-197.

Lendeckel, U., T. Kahne, M. Arndt, K. Frank and S. Ansorge (1998). "Inhibition of alanyl aminopeptidase induces MAP-kinase p42/ERK2 in the human T cell line KARPAS-299." Biochem Biophys Res Commun **252**(1): 5-9.

Levine, N. D. (1963). "Coccidiosis." Annu Rev Microbiol **17**: 179-198.

Levy, M. R., W. A. Siddiqui and S. C. Chou (1974). "Acid protease activity in Plasmodium falciparum and P. knowlesi and ghosts of their respective host red cells." Nature **247**(442): 546-549.

Li, R., X. Chen, B. Gong, P. M. Selzer, Z. Li, E. Davidson, G. Kurzban, R. E. Miller, E. O. Nuzum, J. H. McKerrow, R. J. Fletterick, S. A. Gillmor, C. S. Craik, I. D. Kuntz, F. E. Cohen and G. L. Kenyon (1996). "Structure-based design of parasitic protease inhibitors." Bioorg Med Chem **4**(9): 1421-1427.

Lieke, T., S. Nylen, L. Eidsmo, W. R. McMaster, A. M. Mohammadi, A. Khamesipour, L. Berg and H. Akuffo (2008). "Leishmania surface protein gp63 binds directly to human natural killer cells and inhibits proliferation." Clin Exp Immunol **153**(2): 221-230.

Lim, K. C., E. Sun, M. Bahgat, D. Bucks, R. Guy, R. S. Hinz, C. Cullander and J. H. McKerrow (1999). "Blockage of skin invasion by schistosome cercariae by serine protease inhibitors." Am J Trop Med Hyg **60**(3): 487-492.

Lohn, M., C. Mueller and J. Langner (2002). "Cell cycle retardation in monocytoid cells induced by aminopeptidase N (CD13)." Leuk Lymphoma **43**(2): 407-413.

Luciani, N., C. Marie-Claire, E. Ruffet, A. Beaumont, B. P. Roques and M. C. Fournie-Zaluski (1998). "Characterization of Glu350 as a critical residue involved in the N-terminal amine binding site of aminopeptidase N (EC 3.4.11.2): insights into its mechanism of action." Biochemistry **37**(2): 686-692.

Ma, A. C., T. K. Fung, R. H. Lin, M. I. Chung, D. Yang, S. C. Ekker and A. Y. Leung (2011). "Methionine aminopeptidase 2 is required for HSC initiation and proliferation." Blood **118**(20): 5448-5457.

Mallari, J. P., F. Zhu, A. Lemoff, M. Kaiser, M. Lu, R. Brun and R. K. Guy (2010). "Optimization of purine-nitrile TbcatB inhibitors for use in vivo and evaluation of efficacy in murine models." Bioorg Med Chem **18**(23): 8302-8309.

Marquardt, W. C., B. A. Pafume and D. Bush (1987). "IMMUNITY TO EIMERIA-SEPARATA (APICOMPLEXA, EIMERIINA) - EXPOSE-AND-CHALLENGE STUDIES IN RATS." Journal of Parasitology **73**(2): 342-344.

Matheoud, D., N. Moradin, A. Bellemare-Pelletier, Marina T. Shio, Wan J. Hong, M. Olivier, É. Gagnon, M. Desjardins and A. Descoteaux (2013). "Leishmania Evades Host Immunity by Inhibiting Antigen Cross-Presentation through Direct Cleavage of the SNARE VAMP8." Cell host & microbe **14**(1): 15-25.

Matsubayashi, M., T. Hatta, T. Miyoshi, Anisuzzaman, M. A. Alim, K. Yamaji, K. Shimura, T. Isobe and N. Tsuji (2012). "Synchronous development of Eimeria tenella in chicken caeca and utility of laser microdissection for purification of single stage schizont RNA." Parasitology **139**(12): 1553-1561.

Mbawa, Z. R., I. D. Gumm, E. Shaw and J. D. Lonsdale-Eccles (1992). "Characterisation of a cysteine protease from bloodstream forms of Trypanosoma congolense." Eur J Biochem **204**(1): 371-379.

McDougald, L. R. and T. K. Jeffers (1976). "Comparative in vitro development of precocious and normal strains of Eimeria tenella (Coccidia)." J Protozool **23**(4): 530-534.

McGowan, S. (2013). "Working in concert: the metalloaminopeptidases from Plasmodium falciparum." Curr Opin Struct Biol **12**(13): 00148-00146.

McGowan, S., C. A. Oellig, W. A. Birru, T. T. Caradoc-Davies, C. M. Stack, J. Lowther, T. Skinner-Adams, A. Mucha, P. Kafarski, J. Grembecka, K. R. Trenholme, A. M. Buckle, D. L. Gardiner, J. P. Dalton and J. C. Whisstock (2010). "Structure of the Plasmodium falciparum M17 aminopeptidase and significance for the design of drugs targeting the neutral exopeptidases." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(6): 2449-2454.

McGowan, S., C. J. Porter, J. Lowther, C. M. Stack, S. J. Golding, T. S. Skinner-Adams, K. R. Trenholme, F. Teuscher, S. M. Donnelly, J. Grembecka, A. Mucha, P. Kafarski, R. Degori, A. M. Buckle, D. L. Gardiner, J. C. Whisstock and J. P. Dalton (2009). "Structural basis for the inhibition of the essential Plasmodium falciparum M1 neutral aminopeptidase." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(8): 2537-2542.

McGrath, M. E., A. E. Eakin, J. C. Engel, J. H. McKerrow, C. S. Craik and R. J. Fletterick (1995). "The crystal structure of cruzain: a therapeutic target for Chagas' disease." J Mol Biol **247**(2): 251-259.

McKerrow, J. H. (1999). "Development of cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic diseases: insights on safety, target validation, and mechanism of action." Int J Parasitol **29**(6): 833-837.

McKerrow, J. H., C. Caffrey, B. Kelly, P. Loke and M. Sajid (2006). "Proteases in parasitic diseases." Annu Rev Pathol **1**: 497-536.

McKerrow, J. H., P. S. Doyle, J. C. Engel, L. M. Podust, S. A. Robertson, R. Ferreira, T. Saxton, M. Arkin, I. D. Kerr, L. S. Brinen and C. S. Craik (2009). "Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas disease." Mem Inst Oswaldo Cruz **1**: 263-269.

McKerrow, J. H., J. C. Engel and C. R. Caffrey (1999). "Cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic infections." Bioorg Med Chem **7**(4): 639-644.

McKerrow, J. H., P. J. Rosenthal, R. Swenerton and P. Doyle (2008). "Development of protease inhibitors for protozoan infections." Curr Opin Infect Dis **21**(6): 668-672.

Meirelles, M. N., L. Juliano, E. Carmona, S. G. Silva, E. M. Costa, A. C. Murta and J. Scharfstein (1992). "Inhibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of Trypanosoma cruzi in vitro." Mol Biochem Parasitol **52**(2): 175-184.

Mele, R., M. A. Gomez Morales, F. Tosini and E. Pozio (2003). "Indinavir reduces Cryptosporidium parvum infection in both in vitro and in vivo models." Int J Parasitol **33**(7): 757-764.

Mendoza-Lopez, M. R., C. Becerril-Garcia, L. V. Fattel-Facenda, L. Avila-Gonzalez, M. E. Ruiz-Tachiquin, J. Ortega-Lopez and R. Arroyo (2000). "CP30, a cysteine proteinase involved in Trichomonas vaginalis cytoadherence." Infect Immun **68**(9): 4907-4912.

MEROPS. (2013). "Homo sapiens proteases inhibitors." from http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/speccards?sp=sp001823;type=inhibitor.

Meyers, M. J. and D. E. Goldberg (2012). "Recent advances in plasmepsin medicinal chemistry and implications for future antimalarial drug discovery efforts." Curr Top Med Chem **12**(5): 445-455.

Michaelis, L., M. L. Menten, K. A. Johnson and R. S. Goody (2011). "The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper." Biochemistry **50**(39): 8264-8269.

Michels, M. G., L. C. Bertolini, A. F. Esteves, P. Moreira and S. C. Franca (2011). "Anticoccidial effects of coumestans from Eclipta alba for sustainable control of Eimeria tenella parasitosis in poultry production." Vet Parasitol **177**(1-2): 55-60.

Miller, R. L., D. L. Adamczyk, J. L. Rideout and T. A. Krenitsky (1982). "PURIFICATION, CHARACTERIZATION, SUBSTRATE AND INHIBITOR SPECIFICITY OF ADENOSINE KINASE FROM SEVERAL EIMERIA SPECIES." Molecular and Biochemical Parasitology **6**(4): 209-223.

Millholland, M. G., R. Chandramohanadas, A. Pizzarro, A. Wehr, H. Shi, C. Darling, C. T. Lim and D. C. Greenbaum (2011). "The malaria parasite progressively dismantles the host erythrocyte cytoskeleton for efficient egress." Mol Cell Proteomics **10**(12): 8.

Mita, T. and K. Tanabe (2012). "Evolution of Plasmodium falciparum drug resistance: implications for the development and containment of artemisinin resistance." Jpn J Infect Dis **65**(6): 465-475.

Montero, E., L. M. Gonzalez, M. Rodriguez, Y. Oksov, M. J. Blackman and C. A. Lobo (2006). "A conserved subtilisin protease identified in Babesia divergens merozoites." J Biol Chem **281**(47): 35717-35726.

Montero, E., S. Rafiq, S. Heck and C. A. Lobo (2007). "Inhibition of human erythrocyte invasion by Babesia divergens using serine protease inhibitors." Molecular and Biochemical Parasitology **153**(1): 80-84.

Monzote, L., M. Rodriguez, Y. Alfonso and R. Cox (2013). "Antiretroviral activity of protease inhibitors against Toxoplasma gondii." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **55**(1): 65-67.

Moon, R. P., L. Tyas, U. Certa, K. Rupp, D. Bur, C. Jacquet, H. Matile, H. Loetscher, F. Grueninger-Leitch, J. Kay, B. M. Dunn, C. Berry and R. G. Ridley (1997). "Expression and characterisation of plasmepsin I from Plasmodium falciparum." Eur J Biochem **244**(2): 552-560.

Moon, S. U., J. M. Kang, T. S. Kim, Y. Kong, W. M. Sohn and B. K. Na (2011). "Plasmodium vivax: collaborative roles for plasmepsin 4 and vivapains in hemoglobin hydrolysis." Exp Parasitol **128**(2): 127-132.

Morgan, J. A., G. M. Morris, B. M. Wlodek, R. Byrnes, M. Jenner, C. C. Constantinoiu, G. R. Anderson, A. E. Lew-Tabor, J. B. Molloy, R. B. Gasser and W. K. Jorgensen (2009). "Real-time polymerase chain reaction (PCR) assays for the specific detection and quantification of seven Eimeria species that cause coccidiosis in chickens." Mol Cell Probes **23**(2): 83-89.

Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." J Immunol Methods **65**(1-2): 55-63.

Moura, P. A., J. B. Dame and D. A. Fidock (2009). "Role of Plasmodium falciparum digestive vacuole plasmepsins in the specificity and antimalarial mode of action of cysteine and aspartic protease inhibitors." Antimicrob Agents Chemother **53**(12): 4968-4978.

Muleke, C. I., Y. Ruofeng, X. Lixin, S. Yanming and L. Xiangrui (2006). "Characterization of HC58cDNA, a putative cysteine protease from the parasite Haemonchus contortus." J Vet Sci **7**(3): 249-255.

Murta, S. M., R. T. Gazzinelli, Z. Brener and A. J. Romanha (1998). "Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of Trypanosoma cruzi to benznidazole and nifurtimox." Mol Biochem Parasitol **93**(2): 203-214.

Naciri, M. (2000). "Coccidioses du poulet." Bayer.

Naciri, M. B., F. (2008). "Les coccidioses aviaires : Importance et perspectives de recherche." Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France **162**: 47-50.

Naguleswaran, A., N. Muller and A. Hemphill (2003). "Neospora caninum and Toxoplasma gondii: a novel adhesion/invasion assay reveals distinct differences in tachyzoite-host cell interactions." Exp Parasitol **104**(3-4): 149-158.

Nankya-Kitaka, M. F., G. P. Curley, C. S. Gavigan, A. Bell and J. P. Dalton (1998). "Plasmodium chabaudi chabaudi and P. falciparum: inhibition of aminopeptidase and parasite growth by bestatin and nitrobestatin." Parasitol Res **84**(7): 552-558.

Norton, C. C. and M. J. Chard (1983). "The oocyst sporulation time of Eimeria species from the fowl." Parasitology **86**(Pt 2): 193-198.

Novinec, M., L. Kovacic, B. Lenarcic and A. Baici (2010). "Conformational flexibility and allosteric regulation of cathepsin K." Biochem J **429**(2): 379-389.

O.M.S. (2013). "Dramatic progress achieved in global HIV response since 2001." from http://www.who.int/hiv/en/.

Okubo, K., N. Yokoyama, Y. Govind, A. Alhassan and i. I. Igarash (2007). "Babesia bovis: effects of cysteine protease inhibitors on in vitro growth." Exp. Parasitol. **117**(2): 214-217.

Olson, J. E., G. K. Lee, A. Semenov and P. J. Rosenthal (1999). "Antimalarial effects in mice of orally administered peptidyl cysteine protease inhibitors." Bioorg Med Chem **7**(4): 633-638.

Overall, C. M. and O. Kleifeld (2006). "Towards third generation matrix metalloproteinase inhibitors for cancer therapy." Br J Cancer **94**(7): 941-946.

Padda, R. S., A. Tsai, C. L. Chappell and P. C. Okhuysen (2002). "Molecular cloning and analysis of the Cryptosporidium parvum aminopeptidase N gene." International Journal for Parasitology **32**(2): 187-197.

Page, M. J. and E. Di Cera (2008). "Evolution of peptidase diversity." J Biol Chem **283**(44): 30010-30014.

Palermo, C. and J. A. Joyce (2008). "Cysteine cathepsin proteases as pharmacological targets in cancer." Trends Pharmacol Sci **29**(1): 22-28.

Pamer, E. G., M. So and C. E. Davis (1989). "Identification of a developmentally regulated cysteine protease of Trypanosoma brucei." Mol Biochem Parasitol **33**(1): 27-32.

Peek, H. (2010). "Resistance to anticoccidial drugs: alternative strategies to control coccidiosis in broilers." Thèse **978-90-393-5272-4**.

Peek, H. W. and W. J. Landman (2011). "Coccidiosis in poultry: anticoccidial products, vaccines and other prevention strategies." Vet Q **31**(3): 143-161.

Periz, J., A. C. Gill, L. Hunt, P. Brown and F. M. Tomley (2007). "The microneme proteins EtMIC4 and EtMIC5 of Eimeria tenella form a novel, ultra-high molecular mass protein complex that binds target host cells." J Biol Chem **282**(23): 16891-16898.

Pettersen, E. F., T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng and T. E. Ferrin (2004). "UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis." J Comput Chem **25**(13): 1605-1612.

Peyrottes, S., S. Caldarelli, S. Wein, C. Perigaud, A. Pellet and H. Vial (2012). "Choline analogues in malaria chemotherapy." Curr Pharm Des **18**(24): 3454-3466.

PhRMA (2007). "Drug Discovery and Development." 1-12.

Pinard-Van Der Laan, M. H., J. L. Monvoisin, P. Pery, N. Hamet and M. Thomas (1998). "Comparison of outbred lines of chickens for resistance to experimental infection with coccidiosis (Eimeria tenella)." Poult Sci **77**(2): 185-191.

Poreba, M., S. McGowan, T. S. Skinner-Adams, K. R. Trenholme, D. L. Gardiner, J. C. Whisstock, J. To, G. S. Salvesen, J. P. Dalton and M. Drag (2012). "Fingerprinting the substrate specificity of M1 and M17 aminopeptidases of human malaria, Plasmodium falciparum." PLoS One **7**(2): 16.

Puente, X. S., L. M. Sanchez, C. M. Overall and C. Lopez-Otin (2003). "Human and mouse proteases: a comparative genomic approach." Nat Rev Genet **4**(7): 544-558.

Que, X., J. C. Engel, D. Ferguson, A. Wunderlich, S. Tomavo and S. L. Reed (2007). "Cathepsin Cs are key for the intracellular survival of the protozoan parasite, Toxoplasma gondii." J Biol Chem **282**(7): 4994-5003.

Que, X., H. Ngo, J. Lawton, M. Gray, Q. Liu, J. Engel, L. Brinen, P. Ghosh, K. A. Joiner and S. L. Reed (2002). "The cathepsin B of Toxoplasma gondii, toxopain-1, is critical for parasite invasion and rhoptry protein processing." J Biol Chem **277**(28): 25791-25797.

Ragheb, D., K. Bompiani, S. Dalal and M. Klemba (2009). "Evidence for catalytic roles for Plasmodium falciparum aminopeptidase P in the food vacuole and cytosol." J Biol Chem **284**(37): 24806-24815.

Ragheb, D., S. Dalal, K. M. Bompiani, W. K. Ray and M. Klemba (2011). "Distribution and biochemical properties of an M1-family aminopeptidase in Plasmodium falciparum indicate a role in vacuolar hemoglobin catabolism." J Biol Chem **286**(31): 27255-27265.

Railliet, A. L., A. (1891). "Note sur quelques espèces de coccidies encore peu étudiées." Bulletin de la société de Zoologie de France **16**: 246-280.

Rautenberg, P., R. Schadler, E. Reinwald and H. J. Risse (1982). "Study on a proteolytic enzyme from Trypanosoma congolense. Purification and some biochemical properties." Mol Cell Biochem **47**(3): 151-159.

Rawlings, N. D. and A. J. Barrett (1993). "Evolutionary families of peptidases." Biochem J **290**(Pt 1): 205-218.

Rawlings, N. D. and A. J. Barrett (1995). "Evolutionary families of metallopeptidases." Methods Enzymol **248**: 183-228.

Rawlings, N. D., A. J. Barrett and A. Bateman (2012). "MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors." Nucleic Acids Res **40**(Database issue): 15.

Redmond, A. M., T. Skinner-Adams, K. T. Andrews, D. L. Gardiner, J. Ray, M. Kelly and J. S. McCarthy (2007). "Antimalarial activity of sera from subjects taking HIV protease inhibitors." Aids **21**(6): 763-765.

Reid, A. J., D. Blake, T. D. Otto, A. Sanchez, M. Sanders, Y. Tay, P. Dear, K. Wan, M. Berriman, A. Pain and F. Tomley (2010). Eimeria tenella genome from GeneDB, BBSRC, Wellcome Trust Sanger Institute.

Renslo, A. R. and J. H. McKerrow (2006). "Drug discovery and development for neglected parasitic diseases." Nat Chem Biol **2**(12): 701-710.

Rieux, A., S. Gras, F. Lecaille, A. Niepceron, M. Katrib, N. C. Smith, G. Lalmanach and F. Brossier (2012). "Eimeripain, a cathepsin B-like cysteine protease, expressed throughout sporulation of the apicomplexan parasite Eimeria tenella." PLoS One **7**(3): 22.

Robert-Gangneux, F. and M. L. Darde (2012). "Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis." Clin Microbiol Rev **25**(2): 264-296.

Roos, D. S., R. G. Donald, N. S. Morrissette and A. L. Moulton (1994). "Molecular tools for genetic dissection of the protozoan parasite Toxoplasma gondii." Methods Cell Biol **45**: 27-63.

Rosenthal, P. J. (2011). "Falcipains and other cysteine proteases of malaria parasites." Adv Exp Med Biol **712**: 30-48.

Rosenthal, P. J., G. K. Lee and R. E. Smith (1993). "Inhibition of a Plasmodium vinckei cysteine proteinase cures murine malaria." J Clin Invest **91**(3): 1052-1056.

Rosenthal, P. J., J. H. McKerrow, M. Aikawa, H. Nagasawa and J. H. Leech (1988). "A malarial cysteine proteinase is necessary for hemoglobin degradation by Plasmodium falciparum." J Clin Invest **82**(5): 1560-1566.

Rosenthal, P. J., J. E. Olson, G. K. Lee, J. T. Palmer, J. L. Klaus and D. Rasnick (1996). "Antimalarial effects of vinyl sulfone cysteine proteinase inhibitors." Antimicrob Agents Chemother **40**(7): 1600-1603.

Rosenthal, P. J., P. S. Sijwali, A. Singh and B. R. Shenai (2002). "Cysteine proteases of malaria parasites: targets for chemotherapy." Curr Pharm Des **8**(18): 1659-1672.

Ruecker, A., M. Shea, F. Hackett, C. Suarez, E. M. Hirst, K. Milutinovic, C. Withers-Martinez and M. J. Blackman (2012). "Proteolytic activation of the essential parasitophorous vacuole cysteine protease SERA6 accompanies malaria parasite egress from its host erythrocyte." J Biol Chem **287**(45): 37949-37963.

Russell, D. G. (1987). "The macrophage-attachment glycoprotein gp63 is the predominant C3-acceptor site on Leishmania mexicana promastigotes." Eur J Biochem **164**(1): 213-221.

Russell, D. G. and S. D. Wright (1988). "Complement receptor type 3 (CR3) binds to an Arg-Gly-Asp-containing region of the major surface glycoprotein, gp63, of Leishmania promastigotes." J Exp Med **168**(1): 279-292.

Saxena, A., A. Rai, V. Raina, T. Seth and D. K. Mitra (2010). "Expression of CD13/aminopeptidase N in precursor B-cell leukemia: role in growth regulation of B cells." Cancer Immunol Immunother **59**(1): 125-135.

Scharfstein, J., V. Schmitz, V. Morandi, M. M. Capella, A. P. Lima, A. Morrot, L. Juliano and W. Muller-Esterl (2000). "Host cell invasion by Trypanosoma cruzi is potentiated by activation of bradykinin B(2) receptors." J Exp Med **192**(9): 1289-1300.

Schmitt, C., M. Voegelin, A. Marin, M. Schmitt, F. Schegg, P. Henon, D. Guenot and C. Tarnus (2013). "Selective aminopeptidase-N (CD13) inhibitors with relevance to cancer chemotherapy." Bioorg Med Chem **21**(7): 2135-2144.

Scholtyseck, E. O. (1962). "Electron microscope studies on Eimeria perforans (Sporozoa)." J Protozool **9**: 407-414.

Schomburg, I., A. Chang, S. Placzek, C. Sohngen, M. Rother, M. Lang, C. Munaretto, S. Ulas, M. Stelzer, A. Grote, M. Scheer and D. Schomburg (2013). "BRENDA in 2013: integrated reactions, kinetic data, enzyme function data, improved disease classification: new options and contents in BRENDA." Nucleic Acids Res **41**(Database issue): 29.

Selzer, P. M., S. Pingel, I. Hsieh, B. Ugele, V. J. Chan, J. C. Engel, M. Bogyo, D. G. Russell, J. A. Sakanari and J. H. McKerrow (1999). "Cysteine protease inhibitors as chemotherapy: lessons from a parasite target." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(20): 11015-11022.

Sharman, P. A., N. C. Smith, M. G. Wallach and M. Katrib (2010). "Chasing the golden egg: vaccination against poultry coccidiosis." Parasite Immunol **32**(8): 590-598.

Sheiner, L., J. M. Santos, N. Klages, F. Parussini, N. Jemmely, N. Friedrich, G. E. Ward and D. Soldati-Favre (2010). "Toxoplasma gondii transmembrane microneme proteins and their modular design." Mol Microbiol **9**: 9.

Shim, J. S., R. Rao, K. Beebe, L. Neckers, I. Han, R. Nahta and J. O. Liu (2012). "Selective inhibition of HER2-positive breast cancer cells by the HIV protease inhibitor nelfinavir." J Natl Cancer Inst **104**(20): 1576-1590.

Shirley, M. W. (1995). "Eimeria species and strains of chicken." Biotechnology-Guidelines on Techniques in Coccidiosis Research Luxembourg European Commission DGXII: 1-24.

Silva-Almeida, M., B. A. Pereira, M. L. Ribeiro-Guimaraes and C. R. Alves (2012). "Proteinases as virulence factors in Leishmania spp. infection in mammals." Parasit Vectors **5**(160): 1756-3305.

Silva, A. M., A. Y. Lee, S. V. Gulnik, P. Maier, J. Collins, T. N. Bhat, P. J. Collins, R. E. Cachau, K. E. Luker, I. Y. Gluzman, S. E. Francis, A. Oksman, D. E. Goldberg and J. W. Erickson (1996). "Structure and inhibition of plasmepsin II, a hemoglobin-degrading enzyme from Plasmodium falciparum." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(19): 10034-10039.

Simpson, D. J. (2001). "Proteolytic degradation of cereal prolamins—the problem with proline." Plant Science **161**(5): 825-838.

Skinner-Adams, T. S., C. L. Peatey, K. Anderson, K. R. Trenholme, D. Krige, C. L. Brown, C. Stack, D. M. Nsangou, R. T. Mathews, K. Thivierge, J. P. Dalton and D. L.

Gardiner (2012). "The aminopeptidase inhibitor CHR-2863 is an orally bioavailable inhibitor of murine malaria." Antimicrob Agents Chemother **56**(6): 3244-3249.

Skinner-Adams, T. S., C. M. Stack, K. R. Trenholme, C. L. Brown, J. Grembecka, J. Lowther, A. Mucha, M. Drag, P. Kafarski, S. McGowan, J. C. Whisstock, D. L. Gardiner and J. P. Dalton (2010). "Plasmodium falciparum neutral aminopeptidases: new targets for anti-malarials." Trends Biochem Sci **35**(1): 53-61.

Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson and D. C. Klenk (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." Anal Biochem **150**(1): 76-85.

Song, H., B. Qiu, R. Yan, L. Xu, X. Song and X. Li (2012). "The protective efficacy of chimeric SO7/IL-2 DNA vaccine against coccidiosis in chickens." Res Vet Sci **20**(12): 00339-00336.

Souza, G. S., V. V. do Nascimento, L. P. de Carvalho, E. J. T. de Melo, K. V. Fernandes, O. L. T. Machado, C. A. Retamal, V. M. Gomes and A. D. Carvalho (2013). "Activity of recombinant and natural defensins from Vigna unguiculata seeds against Leishmania amazonensis." Experimental Parasitology **135**(1): 116-125.

Spaccapelo, R., C. J. Janse, S. Caterbi, B. Franke-Fayard, J. A. Bonilla, L. M. Syphard, M. Di Cristina, T. Dottorini, A. Savarino, A. Cassone, F. Bistoni, A. P. Waters, J. B. Dame and A. Crisanti (2010). "Plasmepsin 4-deficient Plasmodium berghei are virulence attenuated and induce protective immunity against experimental malaria." Am J Pathol **176**(1): 205-217.

Stack, C. M., J. Lowther, E. Cunningham, S. Donnelly, D. L. Gardiner, K. R. Trenholme, T. S. Skinner-Adams, F. Teuscher, J. Grembecka, A. Mucha, P. Kafarski, L. Lua, A. Bell and J. P. Dalton (2007). "Characterization of the Plasmodium falciparum M17 leucyl aminopeptidase. A protease involved in amino acid regulation with potential for antimalarial drug development." J Biol Chem **282**(3): 2069-2080.

Steverding, D., D. W. Sexton, X. Wang, S. S. Gehrke, G. K. Wagner and C. R. Caffrey (2012). "Trypanosoma brucei: chemical evidence that cathepsin L is essential for survival and a relevant drug target." Int J Parasitol **42**(5): 481-488.

Strout, R. G. and C. A. Ouellette (1968). "Gametogony of Eimeria tenella (Coccidia) in Cell Cultures." Science **163**: 695-696.

Subramanian, S., M. Hardt, Y. Choe, R. K. Niles, E. B. Johansen, J. Legac, J. Gut, I. D. Kerr, C. S. Craik and P. J. Rosenthal (2009). "Hemoglobin cleavage site-specificity of the

Plasmodium falciparum cysteine proteases falcipain-2 and falcipain-3." PLoS One **4**(4): 9.

Sun, L., L. Niu, X. Zhu, J. Hao, P. Wang and H. Wang (2012). "Antitumour effects of a protease inhibitor, nelfinavir, in hepatocellular carcinoma cancer cells." J Chemother **24**(3): 161-166.

Swenerton, R. K., S. Zhang, M. Sajid, K. F. Medzihradszky, C. S. Craik, B. L. Kelly and J. H. McKerrow (2011). "The oligopeptidase B of Leishmania regulates parasite enolase and immune evasion." J Biol Chem **286**(1): 429-440.

Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei and S. Kumar (2011). "MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods." Mol Biol Evol **28**(10): 2731-2739.

Taylor, M. A. C., R.L.; Wall, R.L (1996). Veterinary Parasitology, Blackwell.

Teuscher, F., J. Lowther, T. S. Skinner-Adams, T. Spielmann, M. W. Dixon, C. M. Stack, S. Donnelly, A. Mucha, P. Kafarski, S. Vassiliou, D. L. Gardiner, J. P. Dalton and K. R. Trenholme (2007). "The M18 aspartyl aminopeptidase of the human malaria parasite Plasmodium falciparum." J Biol Chem **282**(42): 30817-30826.

Tewari, A. K. and B. R. Maharana (2011). "Control of poultry coccidiosis: changing trends." J Parasit Dis **35**(1): 10-17.

Tierney, J. and G. Mulcahy (2003). "Comparative development of Eimeria tenella (Apicomplexa) in host cells in vitro." Parasitol Res **90**(4): 301-304.

Tomley, F. M., J. M. Bumstead, K. J. Billington and P. P. Dunn (1996). "Molecular cloning and characterization of a novel acidic microneme protein (Etmic-2) from the apicomplexan protozoan parasite, Eimeria tenella." Mol Biochem Parasitol **79**(2): 195-206.

Torina, A., A. Agnone, G. Sireci, J. J. Mosqueda, V. Blanda, I. Albanese, M. La Farina, A. Cerrone, F. Cusumano and S. Caracappa (2010). "Characterization of the apical membrane antigen-1 in Italian strains of Babesia bigemina." Transbound Emerg Dis **57**(1-2): 52-56.

Trenholme, K. R., C. L. Brown, T. S. Skinner-Adams, C. Stack, J. Lowther, J. To, M. W. Robinson, S. M. Donnelly, J. P. Dalton and D. L. Gardiner (2010). "Aminopeptidases of malaria parasites: new targets for chemotherapy." Infect Disord Drug Targets **10**(3): 217-225.

Valdivieso, E., A. Rangel, J. Moreno, J. M. Saugar, C. Canavate, J. Alvar and F. Dagger (2010). "Effects of HIV aspartyl-proteinase inhibitors on Leishmania sp." Exp Parasitol **126**(4): 557-563.

van Griensven, J., E. Diro, R. Lopez-Velez, M. Boelaert, L. Lynen, E. Zijlstra, J. C. Dujardin and A. Hailu (2013). "HIV-1 protease inhibitors for treatment of visceral leishmaniasis in HIV-co-infected individuals." Lancet Infect Dis **13**(3): 251-259.

Velmourougane, G., M. B. Harbut, S. Dalal, S. McGowan, C. A. Oellig, N. Meinhardt, J. C. Whisstock, M. Klemba and D. C. Greenbaum (2011). "Synthesis of new (-)-bestatin-based inhibitor libraries reveals a novel binding mode in the S1 pocket of the essential malaria M1 metalloaminopeptidase." J Med Chem **54**(6): 1655-1666.

Vermeire, T., T. Aldenberg, H. Buist, S. Escher, I. Mangelsdorf, E. Paune, E. Rorije and D. Kroese (2013). "OSIRIS, a quest for proof of principle for integrated testing strategies of chemicals for four human health endpoints." Regul Toxicol Pharmacol **4**(13): 007.

Vermeulen, A. N. (1998). "Progress in recombinant vaccine development against coccidiosis. A review and prospects into the next millennium." Int J Parasitol **28**(7): 1121-1130.

Vetro, J. A., B. Dummitt, W. S. Micka and Y. H. Chang (2005). "Evidence of a dominant negative mutant of yeast methionine aminopeptidase type 2 in Saccharomyces cerevisiae." J Cell Biochem **94**(4): 656-668.

Wang, Q., S. Zhang, X. Luo, J. Hou, X. Zhu and X. Cai (2013). "Cloning and characterization of a cathepsin L-like cysteine protease from Taenia pisiformis." Vet Parasitol **194**(1): 26-34.

Ward, E., B. R. Kerry, R. H. Manzanilla-Lopez, G. Mutua, J. Devonshire, J. Kimenju and P. R. Hirsch (2012). "The Pochonia chlamydosporia serine protease gene vcp1 is subject to regulation by carbon, nitrogen and pH: implications for nematode biocontrol." PLoS One **7**(4): 27.

Wasilewski, M. M., K. C. Lim, J. Phillips and J. H. McKerrow (1996). "Cysteine protease inhibitors block schistosome hemoglobin degradation in vitro and decrease worm burden and egg production in vivo." Mol Biochem Parasitol **81**(2): 179-189.

WebMD. (2011). "Protease Inhibitors (PIs) for HIV." from http://www.webmd.com/hiv-aids/protease-inhibitors-pis-for-hiv.

Williams, R. B. (1999). "A compartmentalised model for the estimation of the cost of coccidiosis to the world's chicken production industry." Int J Parasitol **29**(8): 1209-1229.

Withers-Martinez, C., C. Suarez, S. Fulle, S. Kher, M. Penzo, J. P. Ebejer, K. Koussis, F. Hackett, A. Jirgensons, P. Finn and M. J. Blackman (2012). "Plasmodium subtilisin-like protease 1 (SUB1): insights into the active-site structure, specificity and function of a pan-malaria drug target." Int J Parasitol **42**(6): 597-612.

Yao, C., J. E. Donelson and M. E. Wilson (2003). "The major surface protease (MSP or GP63) of Leishmania sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function." Mol Biochem Parasitol **132**(1): 1-16.

Yong, V., V. Schmitz, M. A. Vannier-Santos, A. P. de Lima, G. Lalmanach, L. Juliano, F. Gauthier and J. Scharfstein (2000). "Altered expression of cruzipain and a cathepsin B-like target in a Trypanosoma cruzi cell line displaying resistance to synthetic inhibitors of cysteine-proteinases." Mol Biochem Parasitol **109**(1): 47-59.

Yoshida, N. (2006). "Molecular basis of mammalian cell invasion by Trypanosoma cruzi." An Acad Bras Cienc **78**(1): 87-111.

Zaman, M. A., Z. Iqbal, R. Z. Abbas and M. N. Khan (2012). "Anticoccidial activity of herbal complex in broiler chickens challenged with Eimeria tenella." Parasitology **139**(2): 237-243.

Zhang, L., L. Ma, R. Liu, Y. Zhang, S. Zhang, C. Hu, M. Song, J. Cai and M. Wang (2012). "Eimeria tenella heat shock protein 70 enhances protection of recombinant microneme protein MIC2 subunit antigen vaccination against E. tenella challenge." Vet Parasitol **188**(3-4): 239-246.

Annexes

Annexe 1 : Amorces

Amorces de PCR semi-quantitative

Et-ApN1For: GTTTTATAGCAATCTTATAGTCTTC

Et-ApN1Rev: CGACCCGCAACGAGGAGCATACGC

Et-ApN2For: GGCCGCCACTTCGCCATTTTC

Et-ApN2Rev: GATGAGCTACTTTGGACACC

Et-ApN3For: CAGCAGCAGCGAACGAAAGCTTC

Et-ApN3Rev: GTAACAGGGTTTCCTAAAAGG

ActFor : ATCTTCATCGTAGACGGAGCCAG

ActRev: GTGTGTCCCACACTGTTCCTATC

Amorce Identification *Et*-ApN3 :

F1 : CAGCAGCAGCGAACGAAAGCTTC

F2 : GTTTAGAGACCAACTCTTTTC

F2-3 : CAGCCAACGAAGTTGCCTTTAG

R2-3 CTGCTGCATGTCTGCGAGGAC

Amorce Séquencage :

ApN1For : GTTTTATAGCAATCTTATAGTCTTC

ApN1Rev : CATTGACTGTCCCGTTCTGTTTGCC

Amorces des protéines recombinantes

rApN1ForBgl2: GGGAGATCTCGAAGAGGACGACCAGGGGAGAAATTC

rApN1RevEcoR1: GGCTCTGGACTCACCTCATTCGTCGCCATGAGAATTCGGG

rApN3ForBgl2: GGGAGATCTAACTTGAAACTCTCGGGACTTTACTTGACCAATG

rApN3RevEcoR1: GGAAAGACGGCAAGGGTTACCAGATCATTTGAGAATTCGGG

Annexe 2 : Activité du C36 sur *Toxoplasma gondii*

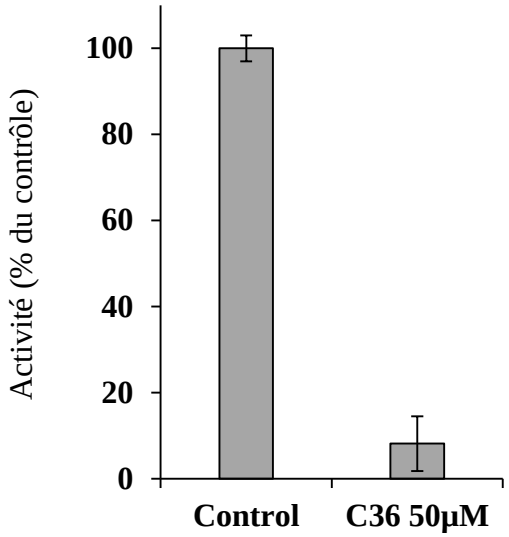


Figure 54 : Inhibition de l'activité aminopeptidase d'un lysat de tachyzoïtes

Inhibition de l'activité aminopeptidase sur le substrat H-Ala-AMC d'un lysat de tachyzoïtes en présence de DMSO (Control) ou de C36 à 50 µM comparé à un témoin sans inhibiteur et sans solvant.

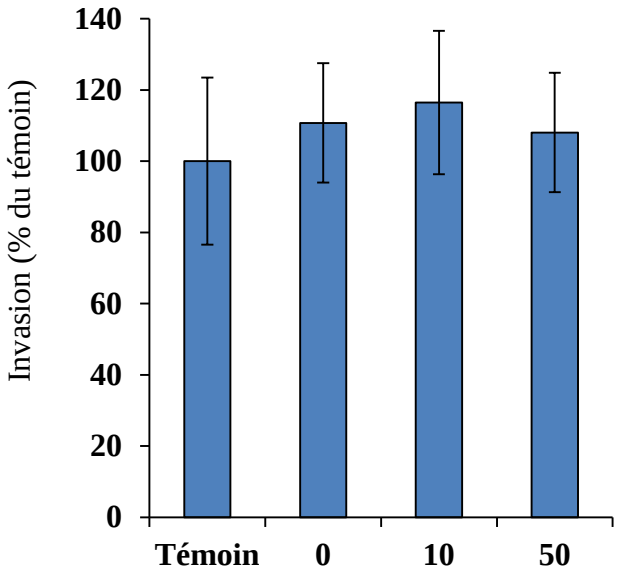


Figure 55 : Influence du C36 sur l'invasion de HFF par *Toxoplasma gondii*

Le pourcentage d'invasion HFF par *Toxoplasma gondii* en présence de différentes concentrations de C36 a été calculé.

Annexe 3 : Dépôt de Brevet du composé C36

R E P U B L I Q U E F R A N C A I S E

INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITE

Réception électronique de la soumission

Il est certifié par la présente qu'une demande de brevet (ou d'un certificat d'utilité) a été reçue par le biais du dépôt électronique sécurisé de l'INPI. Après réception, un numéro d'enregistrement et une date de réception ont été automatiquement attribués.

Numéro de demande	1359289	
Numéro de soumission	1000208945	
Date de réception	26 septembre 2013	
Vos références	247342D32441	
Demandeur	INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE	
Pays	FR	
Titre de l'invention	PREVENTION ET/OU TRAITEMENT DES PARASITOSES INDUITES PAR DES PARASITES APPARTENANT AU PHYLUM DES APICOMPLEXES	
Documents envoyés	package-data.xml	requetefr.xml
	application-body.xml	fr-fee-sheet.xml
	requetefr.pdf (3 p.)	validation-log.xml
	comment.pdf (2 p.)	indication-bio-deposit.xml
	design.pdf (2 p.)	fr-office-specific-info.xml
	dessins.pdf (3 p.)	textebrevet.pdf (30 p.)
Déposé par	EMAIL=tetaz@regimbeau.eu,CN=Franck TETAZ,O=CABINET REGIMBEAU,C=FR	
Méthode de dépôt	Dépôt électronique	
Date et heure de réception électronique	26 septembre 2013, 14:25:24 (CEST)	
Empreinte officielle du dépôt	DE:EA:77:4D:5C:4D:F0:75:F1:6F:E4:18:AC:0D:0F:DD:80:80:53:CB	

INPI - 26 BIS, RUE DE SAINT PETERSBOURG 75800 PARIS CEDEX 08 - TELEPHONE : 0 820 213 213 - TELECOPIE : 01 53 04 52 65
ETABLISSEMENT PUBLIC NATIONAL CREE PAR LA LOI No 51-444 DU 19 AVRIL 1951

PREVENTION ET/OU TRAITEMENT DES PARASITOSES INDUITES PAR DES PARASITES APPARTENANT AU PHYLUM DES APICOMPLEXES

DOMAINE DE L'INVENTION

La présente invention concerne le domaine de la prévention et/ou du traitement des parasitoses induites par des parasites appartenant au phylum des apicomplexes. Plus particulièrement, la présente invention vise à fournir de nouveaux composés utiles dans la prévention et/ou le traitement des coccidioses (infections par *Eimeria spp.*). Les composés de la présente invention s'avèrent également utiles dans la prévention et/ou le traitement de la cryptosporidiose (infections par *Cryptosporidium spp.),* de la toxoplasmose (infections par *Toxoplasma gondii*), de la néosporose (infections induites par *Neospora caninum*) et/ou de la malaria (infections par *Plasmodium spp.*).

ARRIERE PLAN DE L'INVENTION

Les coccidioses du genre *Eimeria* sont des maladies parasitaires touchant de nombreuses espèces telles que les ovins, porcins, bovins, lapins, oiseaux et volailles. Les parasites responsables de ces pathologies sont divers et touchent chacun une espèce propre. Par exemple, les coccidioses aviaires, maladies parasitaires les plus fréquentes chez les volailles, peuvent prendre de nombreuses formes et sont causées par des parasites du genre *Eimeria*, tels qu'*E. acervulina, E. necatrix, E. maxima, E. brunetti, E. tenella, E. mitis, E. praecox*.

D'une manière générale, les parasites responsables des coccidioses appartiennent au phylum des apicomplexes, auquel appartiennent également les parasites responsables de pathologies humaines telles que la malaria ou paludisme (ex : *Plasmodium falciparum, P. vivax, P. malariae, P. ovale, P. knowlesi),* la toxoplasmose (ex : *Toxoplasma gondii*) ou la cryptosporidiose (ex : *Cryptosporidium hominis*).

Sur le plan vétérinaire, la lutte contre les coccidioses aviaires passe généralement par un traitement prophylactique des élevages comprenant l'administration d'anticoccidiens et/ou la vaccination. Le coût élevé des vaccins obtenus à partir de souches atténuées freine le recours à ce mode de traitement dans les élevages de poulets de chair. Ainsi, les éleveurs choisissent très souvent d'avoir recours à des anticoccidiens.

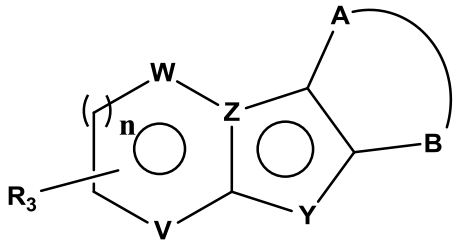
Si les agents anticoccidiens disponibles à ce jour s'avèrent efficaces, les éleveurs doivent cependant faire face à un problème majeur : l'apparition croissante de phénomène de

résistance des parasites aux agents anticoccidiens, essentiellement liée à leur utilisation massive.

Un besoin existe donc pour la mise à disposition de nouveaux agents permettant de prévenir et/ou traiter les parasitoses induites par les parasites appartenant au phylum des apicomplexes, en particulier les coccidioses induites par *Eimeria*.

BREVE DESCRIPTION DE L'INVENTION

La présente invention concerne des composés de formule (I) :



(I)

dans laquelle :

- -**A**-**B**- représente -CO-O-C$\mathbf{R_1}$=C- ou –C=C$\mathbf{R_1}$-**X**-CO-
  - avec **X** représentant un atome d'oxygène ou d'azote ;
  - avec $\mathbf{R_1}$ représentant un groupement alkyle, alcényle, alcynyle, aryle, hétéroaryle ou cycolalkyle, ledit groupement alkyle, alcényle, alcynyle, aryle, hétéroaryle ou cycolalkyle pouvant être substitué, ou non, par un ou plusieurs groupement(s) hydroxyle, halogène, alkyle, alcényle, alcynyle, alkyloxy, alkylthio, amino, nitro, cycloalkyle, aryle, hétéroaryle, ester et/ou cétone ;
- **Y** représente un atome d'azote substitué, ou non, par un groupement $\mathbf{R_2}$ avec $\mathbf{R_2}$ représentant un atome d'hydrogène, un groupement alkyle, aryle, arylalkyle, hétéroaryle, alkylcarbonyle, arylcarbonyle ou hétéroarylcarbonyle ;
- **Z** représente un atome de carbone ou d'azote ;
- **W** représente un atome de carbone ou d'azote, à la condition que lorsque **W** est un atome d'azote, **Z** est un atome d'azote et **V** est un atome de carbone substitué par $\mathbf{R_3}$;
- **n** représente le nombre entier 0 ou 1 ;

- **V** représente un atome de carbone ou de soufre, à la condition que lorsque **V** est un atome de soufre, **n** est égal à 0, **Z** est un atome d'azote et **W** est atome de carbone ;
- $\mathbf{R_3}$ représente un hydrogène, un groupement alkyle, alcényle, alcynyle, alkylthio, arylthio, alkyloxy, aryloxy, aryle, hétéroaryle, amino ou un halogène ;

pour utilisation dans la prévention et/ou le traitement des parasitoses induites par des parasites appartenant au phylum des apicomplexes.

La présente invention concerne également des compositions pharmaceutiques ou vétérinaires comprenant au moins un composé de la présente invention et au moins un excipient acceptable.

Enfin, la présente invention concerne des combinaisons comprenant au moins un composé de la présente invention et au moins un agent antiparasitaire.

BREVE DESCRIPTION DES DESSINS

La figure 1 représente des images de microscopie à fluorescence de cellules MDBK infectées par *E. tenella* en présence du composé C36 comparées à un contrôle (A : Schizontes ; B : Sporozoïtes)

La figure 2 représente un graphique illustrant l'inhibition dose dépendante du développement des parasites *Eimeria tenella* par le composé C36. Les ◊ illustrent le pourcentage d'invasion par rapport au témoin DMSO en fonction de de la concentration en composé C36. Les □ illustrent le pourcentage de développement par rapport au témoin DMSO en fonction de la concentration en composé C36.

La figure 3 représente un graphique illustrant les effets des composés C36, C36.02, C36.04 et C36.05 sur l'invasion et le développement des parasites *Eimeria tenella.* Pour chaque essai, la barre de gauche représente le pourcentage de parasites ayant envahi comparé au contrôle et la barre de droite représente le pourcentage de développement comparé au contrôle.

La figure 4A représente un graphique illustrant la diminution dose dépendante de la surface des plages de lyses en fonction des concentrations croissantes en composé C36.

La figure 4B représente des images de microscopie photonique (objectif x4).

La figure 5 représente un graphique illustrant l'inhibition dose dépendante de la croissance de *P. falciparum* en fonction des concentrations croissantes en composé C36.

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

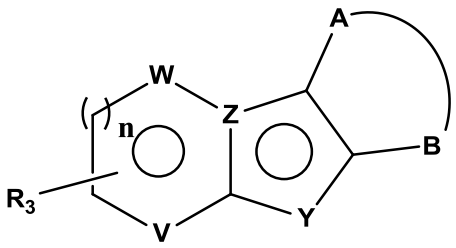
Les inventeurs ont découvert que le développement des parasites appartenant au phylum des apicomplexes peut être bloqué par des composés appartenant à la classe des pyranones. Ces composés, ici désignés par le terme « composé(s) de la présente invention », présentent ainsi un intérêt dans la prévention et/ou le traitement des parasitoses induites par des parasites appartenant au phylum des apicomplexes. Des exemples de parasitoses induites par des parasites appartenant au phylum des apicomplexes incluent les coccidioses (infections induites par *Eimeria spp.*), la malaria (infections induites par *Plasmodium spp*.), la toxoplasmose (infections induites par *Toxoplasma gondii*), la néosporose (infections induites par *Neospora caninum*) ou la cryptosporidiose (infections induites par *Cryptosporidium spp.*).

En particulier, les inventeurs ont montré que le développement des parasites du genre *Eimeria tenella*, *Plasmodium falciparum* et *Toxoplasma gondii* peut être bloqué par les composés de la présente invention. Les composés de la présente invention présentent ainsi tout particulièrement un intérêt dans la prévention et/ou le traitement des coccidioses, de la malaria et/ou de la toxoplasmose.

Plus spécifiquement, les inventeurs ont mis en évidence que les composés de la présente invention inhibent ou diminuent l'activité d'au moins une protéase appartenant à la famille des aminopeptidases N, protéases essentielles au développement des parasites et présentes chez la majorité des parasites appartenant au phylum des apicomplexes. Ainsi, les inventeurs ont mis en évidence que les composés de la présente invention inhibent ou diminuent l'activité de la protéase EtApN1 chez *Eimeria tenella*. De manière avantageuse, les composés de la présente invention bloquent le développement parasitaire sans inhiber l'invasion. Le maintien de l'invasion permet une activation du système immunitaire des animaux, permettant *in fine* de limiter le recours à des traitements complémentaires pour traiter les parasitoses, en particulier les coccidioses.

De manière avantageuse, les composés de la présente invention sont actifs à des doses inférieures aux inhibiteurs commerciaux connus d'aminopeptidases perméables aux cellules, tels que le 1,10-ortho-phénanthroline et l'hydrochlorure de bestatine. Les doses peuvent être inférieures d'un facteur 10 (diminution de l'IC50 pour *Eimeria in vitro* par rapport à l'hydrochlorure de bestatine). En particulier, le composé C36 (voir ci-dessous) s'est avéré inhiber l'activité de la protéase EtApN1 dans un lysat parasitaire à une concentration 20 fois inférieure à celle du 1,10-ortho-phénanthroline et de l'hydrochlorure de bestatine. Par ailleurs, les composés de la présente invention ne présentent pas de toxicité *in vitro*.

Les composés de la présente invention, utiles dans la prévention et/ou le traitement des parasitoses induites par des parasites appartenant au phylum des apicomplexes, présentent la formule générale (I):



(I)

dans laquelle :

- -**A**-**B**- représente -CO-O-C$\mathbf{R_1}$=C- ou –C=C$\mathbf{R_1}$-**X**-CO-
  - avec **X** représentant un atome d'oxygène ou d'azote ;
  - avec $\mathbf{R_1}$ représentant un groupement alkyle, alcényle, alcynyle, aryle, hétéroaryle ou cycolalkyle, ledit groupement alkyle, alcényle, alcynyle, aryle, hétéroaryle ou cycolalkyle pouvant être substitué, ou non, par un ou plusieurs groupement(s) hydroxyle, halogène, alkyle, alcényle, alcynyle, alkyloxy, alkylthio, amino, nitro, cycloalkyle, aryle, hétéroaryle, ester et/ou cétone ;
- **Y** représente un atome d'azote substitué, ou non, par un groupement $\mathbf{R_2}$ avec $\mathbf{R_2}$ représentant un atome d'hydrogène, un groupement alkyle, aryle, arylalkyle, hétéroaryle, alkylcarbonyle, arylcarbonyle ou hétéroarylcarbonyle ;
- **Z** représente un atome de carbone ou d'azote ;
- **W** représente un atome de carbone ou d'azote, à la condition que lorsque **W** est un atome d'azote, **Z** est un atome d'azote et **V** est un atome de carbone substitué par $\mathbf{R_3}$, de préférence $\mathbf{R_3}$ est un halogène ;
- **n** représente le nombre entier 0 ou 1 ;
- **V** représente un atome de carbone ou de soufre, à la condition que lorsque **V** est un atome de soufre, **n** est égal à 0, Z est un atome d'azote et **W** est un atome de carbone ;
- $\mathbf{R_3}$ représente un hydrogène, un groupement alkyle, alcényle, alcynyle, alkylthio, arylthio, alkyloxy, aryloxy, aryle, hétéroaryle, amino ou un halogène.

Le terme « alkyle » tel qu'utilisé dans la description de la présente invention, en particulier dans les définitions des substituants $\mathbf{R_1}$, $\mathbf{R_2}$ et $\mathbf{R_3}$, désigne une chaîne hydrocarbonée linéaire ou ramifiée, de préférence comprenant de 1 à 12 atomes de carbone. Des exemples de groupement « alkyle » incluent, de manière non limitative, les groupements méthyle, éthyle, propyle, butyle, pentyle, hexyle, heptyle, octyle, nonyle, décyle, undécyle, dodécyle, isobutyle, isopropyle, t-butyle et 1,1-diméthylpropyle. Dans des modes de réalisation particuliers de la présente invention, $\mathbf{R_1}$, $\mathbf{R_2}$ et $\mathbf{R_3}$ représentent indépendamment l'un de l'autre un groupement alkyle comprenant de 1 à 6 atomes de carbone.

Le terme « alcényle » tel qu'utilisé dans la description de la présente invention, en particulier dans les définitions des substituants $\mathbf{R_1}$ et $\mathbf{R_3}$, désigne une chaîne hydrocarbonée d'au moins deux atomes de carbone, linéaire ou ramifiée, comprenant au moins une double liaison carbone-carbone, de préférence comprenant au plus 12 atomes de carbone. Des exemples de groupement « alcényle » incluent, de manière non limitative, les groupements éthényle, propényle et buténYle.

Le terme « alcynyle » tel qu'utilisé dans la description de la présente invention, en particulier dans les définitions des substituants $\mathbf{R_1}$ et $\mathbf{R_3}$, désigne une chaîne hydrocarbonée d'au moins deux atomes de carbone, linéaire ou ramifiée, comprenant au moins une triple liaison carbone-carbone, de préférence comprenant au plus 12 atomes de carbone. Des exemples de groupement « alcynyle» incluent, de manière non limitative, les groupements éthynyle, propynyle, butynyle, pentynyle et hexynyle.

Le terme « arylalkyle » tel qu'utilisé dans la description de la présente invention, en particulier dans la définition du substituant $\mathbf{R_2}$, désigne un groupement alkyle tel que défini ci-dessus lié à un groupement « aryle » tel que défini ci-dessous. Un exemple de groupement « arylalkyle » inclut le groupement benzyle.

Le terme « aryle » tel qu'utilisé dans la description de la présente invention, en particulier dans les définitions des substituants $\mathbf{R_1}$, $\mathbf{R_2}$ et $\mathbf{R_3}$, désigne un système cyclique aromatique. Des exemples de groupement « aryle » incluent, de manière non limitative, les carbocycles aromatiques comprenant 5, 6, 7 ou 8 chaînons, tels que le phényle. Le terme « aryle » tel

qu'utilisé dans la description de la présente invention inclut également les systèmes polycycliques comprenant au moins un cycle aromatique fusionné à au moins un autre cycle qui peut être aromatique ou non aromatique.

Le terme « hétéroaryle » tel qu'utilisé dans la description de la présente invention, en particulier dans les définitions des substituants $\mathbf{R_1}$, $\mathbf{R_2}$ et $\mathbf{R_3}$, désigne un cycle aromatique comprenant de 5 à 8 chaînons et contenant un ou plusieurs hétéroatomes choisis parmi l'oxygène, le soufre ou l'azote, tels que 2 ou 3 hétéroatomes. Le terme « hétéroaryle » tel qu'utilisé dans la description de la présente invention inclut également les systèmes polycycliques comprenant au moins un cycle aromatique comprenant de 5 à 8 chaînons et contenant un ou plusieurs hétéroatomes choisis parmi l'oxygène, le soufre ou l'azote. Des exemples de groupement « hétéroaryle » incluent, de manière non limitative, les groupements dérivants du thiophène, pyrrole, benzofurane, indole, pyridine, imidazole et pyrazine.

Le terme « alkyloxy » tel qu'utilisé dans la description de la présente invention, en particulier dans les définitions des substituants $\mathbf{R_1}$ et $\mathbf{R_3}$, désigne un radical monovalent de formule **R**-O- dans laquelle **R** désigne une chaîne hydrocarbonée, linéaire ou ramifiée, de préférence comprenant de 1 à 12 atomes de carbone. Des exemples de groupement « alkyloxy» incluent, de manière non limitative, les groupements méthoxy, éthoxy, propoxy, prop-2-oxy, butoxy, but-2-oxy, 1-méthyléthyle-oxy, pentoxy ou hexyloxy.

Le terme « aryloxy » tel qu'utilisé dans la description de la présente invention, en particulier dans les définitions du substituant $\mathbf{R_3}$, désigne un radical monovalent de formule **R'**-O- dans laquelle **R'** désigne un groupement « aryle » tel que défini ci-dessus.

Le terme « cycloalkyle » tel qu'utilisé dans la description de la présente invention, en particulier dans la définition du substituant $\mathbf{R_1}$, désigne un cycle hydrocarboné non aromatique comprenant au moins 3 chaînons et de préférence au plus 7 chaînons. Des exemples de groupement « cycloalkyle» incluent, de manière non limitative, les groupements cyclopropyle, cyclobutyle, cyclopentyle ou cyclohexyle.

Le terme « amino» tel qu'utilisé dans la description de la présente invention, en particulier dans les définitions des substituants $\mathbf{R_1}$ et $\mathbf{R_3}$, désigne un groupement amine substitué, ou

non, par un ou deux groupements choisis parmi les groupements alkyle, alcényle, alcynyle et/ou aryle. Les groupements alkyle, alcényle, alcynyle et aryle sont tels que définis ci-dessus.

Le terme « halogène » tel qu'utilisé dans la description de la présente invention, en particulier dans la définition du substituant $\mathbf{R_3}$, désigne les éléments fluor, chlore, brome et iode.

Le terme « alkylcarbonyle » tel qu'utilisé dans la description de la présente invention, en particulier dans la définition du substituant $\mathbf{R_2}$, désigne un groupement carbonyle (C=O) attaché à un groupement alkyle, le groupement alkyle étant tel que défini ci-dessus.

Le terme « arylcarbonyle » tel qu'utilisé dans la description de la présente invention, en particulier dans la définition du substituant $\mathbf{R_2}$, désigne un groupement carbonyle (C=O) attaché à un groupement aryle, le groupement aryle étant tel que défini ci-dessus.

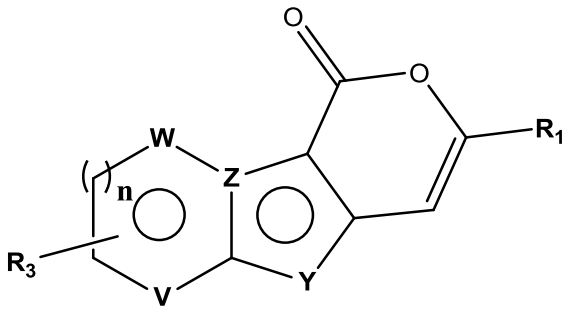
Le terme « hétéroarylcarbonyle » tel qu'utilisé dans la description de la présente invention, en particulier dans la définition du substituant $\mathbf{R_2}$, désigne un groupement carbonyle (C=O) attaché à un groupement hétéroaryle, le groupement hétéroaryle étant tel que défini ci-dessus.

Le terme « alkylthio » tel qu'utilisé dans la description de la présente invention, en particulier dans la définition du substituant $\mathbf{R_3}$, désigne un atome de soufre attaché à un groupement «alkyle », le groupement alkyle étant tel que défini ci-dessus.

Le terme « arylthio » tel qu'utilisé dans la description de la présente invention, en particulier dans la définition du substituant $\mathbf{R_3}$, désigne un atome de soufre attaché à un groupement «aryle », le groupement aryle étant tel que défini ci-dessus.

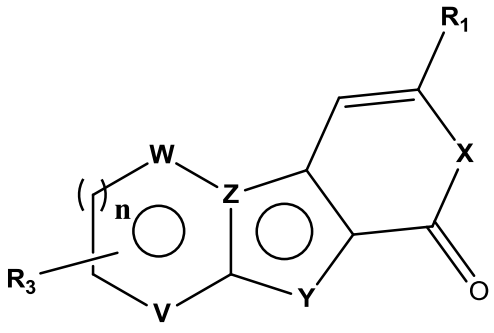
Le terme « ester » tel qu'utilisé dans la description de la présente invention, en particulier dans les définitions des substituants $\mathbf{R_1}$, désigne un groupement –CO-O-**R** dans laquelle **R** désigne une chaîne hydrocarbonée, linéaire ou ramifiée, de préférence comprenant de 1 à 12 atomes de carbone.

En particulier, lorsque -**A**-**B**- représente -CO-O-C$\mathbf{R_1}$=C-, les composés de la présente invention présentent la formule générale (Kim, Haraguchi *et al.*) suivante dans laquelle **V**, **W**, **Y**, **Z**, $\mathbf{R_1}$ et $\mathbf{R_3}$ et n sont tels que définis ci-dessus :



(Kim, Haraguchi *et al.*)

Lorsque -**A**-**B**- représente –C=C$\mathbf{R_1}$-**X**-CO-, les composés de la présente invention présentent la formule générale (III) suivante dans laquelle **V**, **W**, **X**, **Y**, **Z**, $\mathbf{R_1}$ et $\mathbf{R_3}$ et n sont tels que définis ci-dessus :



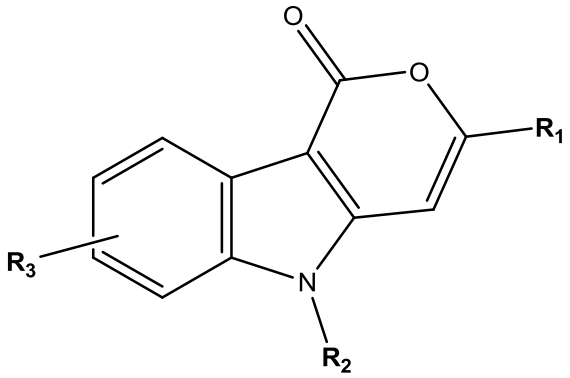
(III)

Dans des modes de réalisations particuliers, les composés de la présente invention présentent la formule (I), (Kim, Haraguchi *et al.*) ou (III) dans laquelle **Y** représente un atome d'azote substitué par un groupement $\mathbf{R_2}$ avec $\mathbf{R_2}$ représentant un groupement alkyle, aryle, arylalkyle, hétéroaryle, alkylcarbonyle, arylcarbonyle ou hétéroarylcarbonyle et **V**, **W**, **Z,** $\mathbf{R_1}$, $\mathbf{R_3}$, **X** et n sont tels que définis ci-dessus.

Dans des modes de réalisations particuliers, les composés de la présente invention présentent la formule (I), (Kim, Haraguchi *et al.*) ou (III) dans laquelle **V**, **W** et **Z** représentent un atome de carbone, **Y** représente un atome d'azote substitué par un groupement $\mathbf{R_2}$ tel que défini ci-dessus, n est égal à 1 et $\mathbf{R_1}$, $\mathbf{R_3}$ et **X** sont tels que définis ci-dessus. De préférence, dans ces

modes de réalisations, **X** est un atome d'oxygène et/ou $\mathbf{R_2}$ représente un groupement alkyle, aryle, arylalkyle, hétéroaryle, alkylcarbonyle, arylcarbonyle ou hétéroarylcarbonyle.

Ainsi, dans des modes de réalisations particuliers, lorsque que -**A**-**B**- représente -CO-O-C$\mathbf{R_1}$=C-, les composés de la présente invention présentent la formule (IV) suivante :

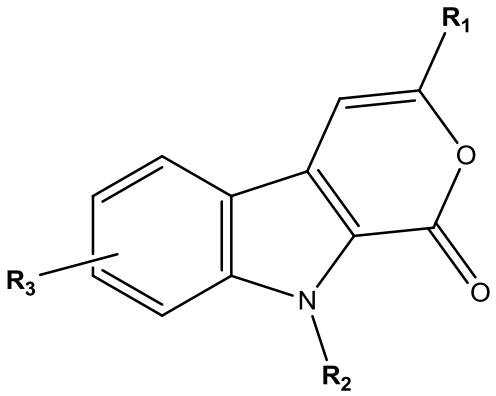


(IV)

dans laquelle :

- $\mathbf{R_1}$ représente un groupement alkyle, alcényle, alcynyle, aryle, hétéroaryle ou cycolalkyle, ledit groupement alkyle, alcényle, alcynyle, aryle, hétéroaryle ou cycolalkyle pouvant être substitué, ou non, par un ou plusieurs groupement(s) hydroxyle, halogène, alkyle, alcényle, alcynyle, alkyloxy, alkylthio, amino, nitro, cycloalkyle, aryle, hétéroaryle, ester et/ou cétone ;
- $\mathbf{R_2}$ représente un groupement alkyle, aryle, arylakyle, hétéroaryle, alkylcarbonyle, arylcarbonyle ou hétéroarylcarbonyle ;
- $\mathbf{R_3}$ représente un hydrogène, un groupement alkyle, alcényle, alcynyle, arylthio, alkylthio, aryloxy, alkyloxy, aryle, hétéroaryle, amino ou un halogène.

Dans d'autres modes de réalisations particuliers, les composés de la présente invention présentent la formule (V) suivante :



(V)

dans laquelle :

- **R_1** représente un groupement alkyle, alcényle, alcynyle, aryle, hétéroaryle ou cycolalkyle, ledit groupement alkyle, alcényle, alcynyle, aryle, hétéroaryle ou cycolalkyle pouvant être substitué, ou non, par un ou plusieurs groupement(s) hydroxyle, halogène, alkyle, alcényle, alcynyle, alkyloxy, alkylthio, amino, nitro, cycloalkyle, aryle, hétéroaryle, ester et/ou cétone ;

- **R_2** représente un groupement alkyle, aryle, arylalkyle, hétéroaryle, alkylcarbonyle, arylcarbonyle ou hétéroarylcarbonyle ;

- **R_3** représente un hydrogène, un groupement alkyle, alcényle, alcynyle, alkylthio, arylthio, alkyloxy, aryloxy, aryle, hétéroaryle, amino ou un halogène.

En particulier, les composés de la présente invention peuvent présenter la formule (I), (Kim, Haraguchi *et al.*), (III), (IV) ou (V) dans laquelle :

- **R_1** représente :

  - un groupement alkyle ou alcényle comprenant de 1 à 6 atomes de carbone, substitué, ou non, par un ou plusieurs groupement(s) hydroxyle, alkyloxy, ester, alcyne et/ou cycloalkyle ;

  - un groupement phényle ;

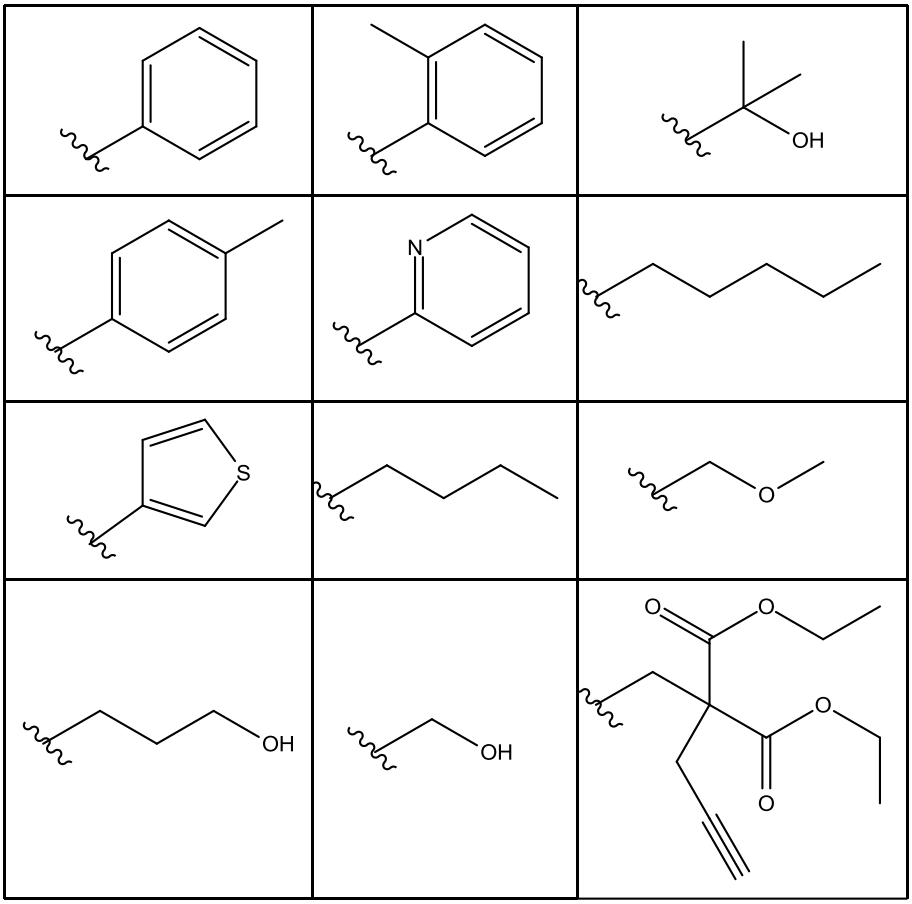
  - un groupement phényle substitué en ortho, méta ou para par un groupement alkyle comprenant de 1 à 3 atomes de carbone, halogène, alkyloxy, alkylthio, nitro ou amino ; ou

  - un groupement thiophène ou pyridine ; et/ou

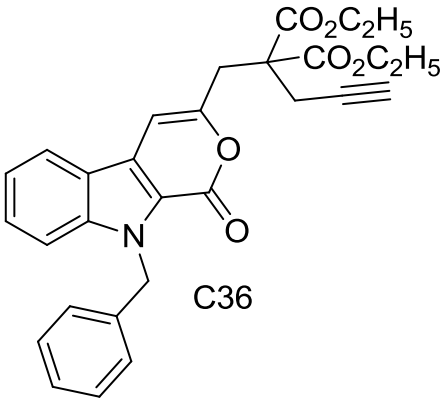
- **R_2** représente un groupement benzyle ; et/ou

- **R_3** représente un hydrogène.

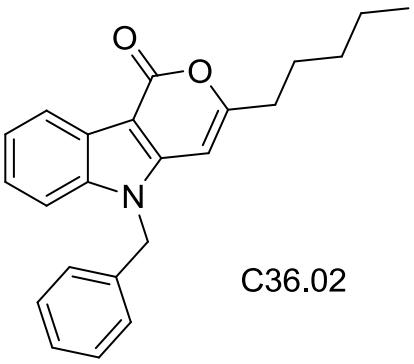
Le groupement $\mathbf{R_1}$ peut tout particulièrement être choisi parmi les groupements suivants :



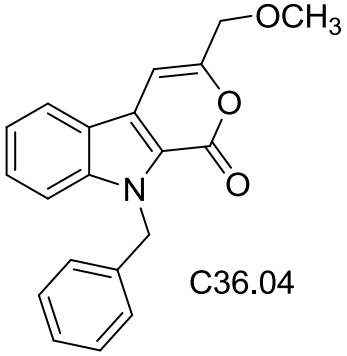
Dans des modes de réalisations particuliers, les composés de la présente invention présentent les structures suivantes :



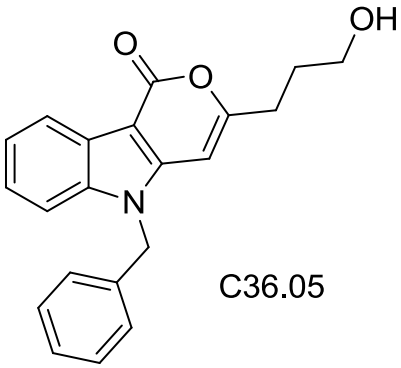
C36



C36.02

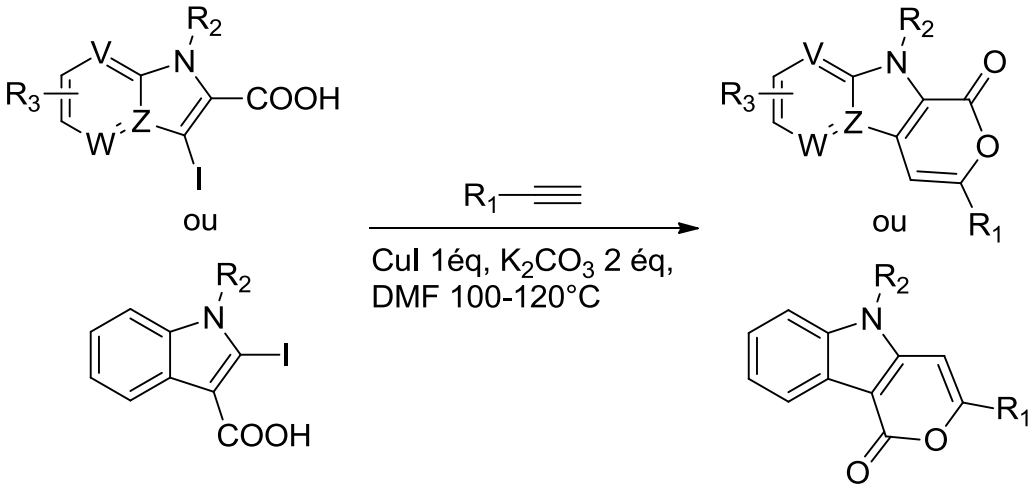


C36.04



C36.05

Les composés de la présente invention peuvent être préparés selon des méthodes connues de l'homme du métier et qui peuvent être telles que décrites dans J.Org.Chem., 2011, 76, 8347-8354. En particulier, les composés de la présente invention peuvent être préparés selon le schéma réactionnel suivant :



Les composés de la présente invention sont utilisés pour prévenir et/ou traiter les parasitoses induites par des parasites appartenant au phylum des apicomplexes. En particulier, ils peuvent être utilisés pour prévenir et/ou traiter les coccidioses, telles que les coccidioses aviaires, bovines, porcines ou ovines.

Les composés de la présente invention peuvent également être utilisés pour prévenir et/ou traiter la malaria (infections par *Plasmodium spp.*), la toxoplasmose (infections par *Toxoplasma gondii*), la néosporose (infections par *Neospora caninum*) et/ou la cryptosporidiose, en particulier des ruminants et de l'homme (infections par *Cryptosporidium parvum* et *hominis*).

Les composés de la présente invention peuvent être administrés seuls ou en combinaison avec des excipients acceptables dans une composition pharmaceutique et/ou vétérinaire. Ainsi, la présente invention concerne également une composition pharmaceutique ou vétérinaire comprenant au moins un composé de la présente invention et au moins un excipient acceptable. La composition pharmaceutique ou vétérinaire peut être utilisée pour prévenir et/ou traiter les parasitoses induites par des parasites appartenant au phylum des apicomplexes, telles que les coccidioses, la malaria, la toxoplasmose, la néosporose et/ou la cryptosporidiose. De préférence, la composition pharmaceutique ou vétérinaire peut être utilisée pour prévenir et/ou traiter les coccidioses, la malaria et/ou la toxoplasmose.

De manière non limitative, des exemples d'excipients acceptables incluent les solvants, agents d'écoulement, agents de mise en suspension, agents de solubilisation, stabilisants, conservateurs.

Dans certains modes de réalisations, les composés de la présente invention peuvent être administrés en combinaison avec d'autres agents utiles dans le traitement des parasitoses (agents antiparasitaires). Ainsi, la présente invention concerne également une combinaison comprenant au moins un composé de la présente invention tel que décrit ci-dessus et au moins un autre agent utile dans le traitement des parasitoses (agent antiparasitaire).

Par exemple, dans le cadre de la prévention et/ou du traitement des coccidioses, les agents antiparasitaires peuvent être des produits chimiques de synthèse qui altèrent le métabolisme des parasites (décoquinate, diclazuril, halofuginone, nicarbazine et robénidine) et/ou des ionophores dérivés de la fermentation microbienne, qui inhibent le transport des ions

à travers la membrane du parasite (lasalocid, maduramicine, narasin, salinomycine, semduramicine et monensin).

La combinaison peut ainsi être utilisée pour prévenir et/ou traiter les parasitoses induites par des parasites appartenant au phylum des apicomplexes, telles que les coccidioses, la malaria, la toxoplasmose, la néosporose et/ou la cryptosporidiose, de préférence les coccidioses, la malaria et/ou la toxoplasmose.

Les composés individuels d'une telle combinaison peuvent être administrés séparément à différents moments au cours du traitement ou de manière concomitante dans des formes combinées ou séparées. Ainsi, la combinaison de la présente invention peut être destinée à une utilisation sous forme combinée ou séparée.

La combinaison décrite ci-dessus peut également être présente au sein d'une composition pharmaceutique et/ou vétérinaire. Ainsi, la présente invention concerne également une composition pharmaceutique ou vétérinaire comprenant au moins un composé de la présente invention tel que décrit ci-dessus, au moins un agent antiparasitaire et au moins un excipient acceptable pouvant être utilisée dans la prévention et/ou le traitement des parasitoses induites par des parasites appartenant au phylum des apicomplexes, telles que les coccidioses, la malaria, la toxoplasmose, la néosporose et/oula cryptosporidiose, de préférence les coccidioses, la malaria et/ou la toxoplasmose.

Les composés ou compositions de la présente invention destiné(e)s au traitement des humains peuvent être administrés par voie orale ou par voie parentérale, incluant les administrations intraveineuses, intramusculaires, intrapéritonéales, subcutanées, rectales ou topiques. Les compositions se présentent alors sous toutes formes appropriées selon les modes d'administration souhaités. En particulier, les compositions pharmaceutiques peuvent se présenter sous forme de poudre, lyophilisât, cachet, gélule, pilule, granule, comprimé, gel, pommade, crème, sirop, solution injectable, spray, patch.

Les composés ou compositions de la présente invention destiné(e)s au traitement des animaux peuvent être administrées selon toutes voies d'administration bien connues dans le domaine et adaptées au traitement de chacun des animaux. De préférence, elles sont administrées par voies orale et parentérale. Les compositions se présentent alors sous toutes formes appropriées selon les modes d'administration souhaités. Elles peuvent donc être sous la forme d'une solution ou d'une suspension liquide orale ou injectable, ou sous la forme

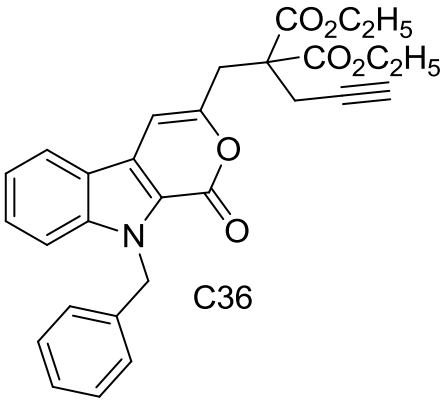
solide ou semi-solide, de poudres, de comprimés, de capsules, de granules, de dragées, de gélules, de sprays, de cachets, de pilules, de tablettes, ou de pâtes. Par ailleurs dans le cas de formulations orales, celles-ci peuvent être administrées directement aux animaux ou bien mélangées à la nourriture.

La présente invention concerne également les composés de la présente invention pour leur utilisation en thérapie. Ainsi, la présente invention concerne également une méthode de prévention et/ou traitement des parasitoses induites par des parasites appartenant au phylum des apicomplexes comprenant l'administration à un sujet d'une dose efficace d'au moins un composé de la présente invention tel que décrit ci-dessus ou d'une composition comprenant au moins un composé de la présente invention tel que décrit ci-dessus et au moins un excipient acceptable. Le sujet peut être un humain ou un animal. En particulier, l'animal peut être choisi parmi les volailles et les ruminants.

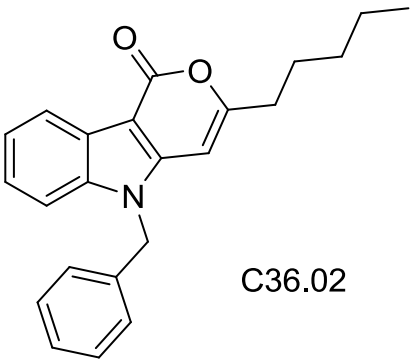
La présente invention concerne, enfin, l'utilisation d'au moins un composé de la présente invention tel que décrit ci-dessus pour la préparation d'un médicament pour prévenir et/ou traiter les parasitoses induites par des parasites appartenant au phylum des apicomplexes, telles que les coccidioses, la malaria, la toxoplasmose, la néosporose ou la cryptosporidiose.

EXEMPLES

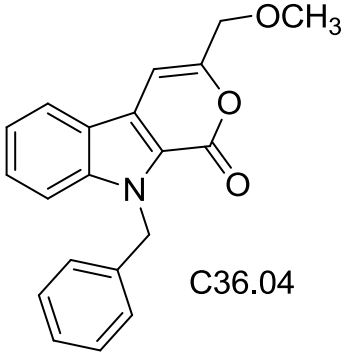
Préparation des composés C36, C36.02, C36.04 et C36.05



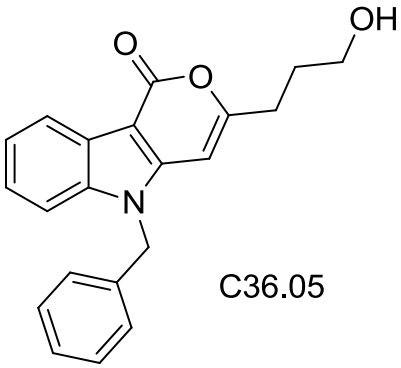
C36



C36.02

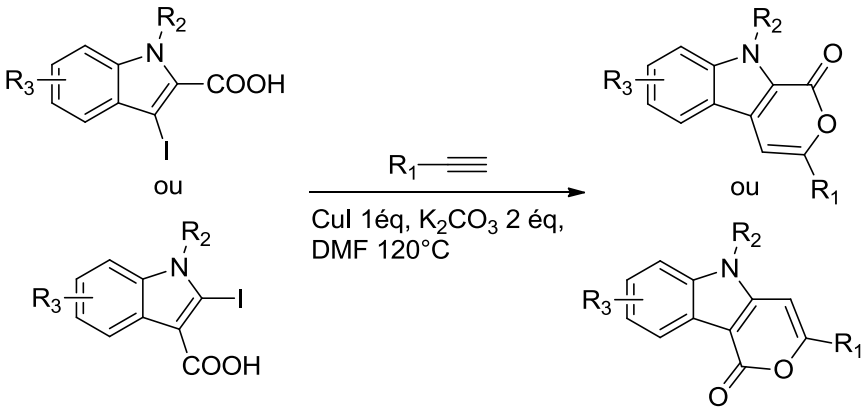


C36.04



C36.05

Les composés C36, C36.02, C36.04 et C36.05 sont préparés selon la méthode décrite dans J.Org.Chem. 2011, 76, 8347-8354.



Procédure générale d'obtention du noyau indolopyran-1-one :

Dans un tube de Schlenk équipé d'un barreau aimanté, sont introduits 552 mg de K_2CO_3 (4 mmol, 2 équivalents) et 750 mg d'acide iodoindolylcarboxylique (2 mmol, 1 équivalent), ainsi que 15 mL de DMF anhydre. La suspension est agitée pendant 15 minutes puis dégazée sous vide à -80°C et mise sous argon. Après avoir atteint la température ambiante, l'alcyne (4 mmol, 2 équivalents) est ajouté ainsi que 381 mg de CuI (2 mmol, 1 équivalent). Le tube de

Schlenk est placé et agité dans un bain d'huile préchauffé à 110-120°C pendant 24-48h. Le mélange est ensuite refroidi à température ambiante et hydrolysé à 0°C avec une solution aqueuse saturée de NH_4Cl (15 mL) ; 50 mL d'éther sont ajoutés dans le tube de Schlenk et le mélange est filtré sur Celite®. La Celite® est ensuite lavée avec 50 mL d'éther. La phase aqueuse est éliminée et la phase organique est lavée trois fois avec de l'eau (3 x 15 mL). La phase organique est séchée sur $MgSO_4$ et concentrée sous vide. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie flash sur gel de silice pour donner les indolopyranones désirées.

2-[(9-Benzyl-1,9-dihydro-1-oxopyrano[3,4-*b*]indol-3-yl)methyl]-2-(prop-2ynyl)malonate de diéthyle (C36)

Rendement: 30%; solide blanc. Mp: 165-166 °C. IR (KBr): 3256, 1735, 1709, 1628.

^{1}H RMN(300MHz,$CDCl_3$): 1.31 (t, 6H, J = 7.1), 2.15 (t,1H, J = 2.5), 2.87 (d, 2H,J = 2.5), 3.44 (s, 2H), 4.25-4.37 (m, 4H), 5.89 (s, 2H), 6.90 (s, 1H),7.01-7.34 (m, 6H), 7.40-7.50 (m, 2H), 7.89 (d, 1H, J = 8.0).

^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$): 14.1, 22.9, 36.3, 48.1, 56.3, 62.3, 72.2, 79.0, 102.0, 111.5, 121.2, 121.3, 121.8, 125.6, 126.4, 127.1, 127.6, 128.1, 128.8, 137.5, 140.9, 151.2, 156.7, 169.3.

MS (70 eV, EI) m/z (%) = 485 (M•+, 19), 441 (40), 368 (17), 367 (33), 294 (11), 288 (17), 91 (100).

HRMS (ESI): calcul anal. pour $C_{29}H_{27}NO_6$ (M+H) 486.1911, mesuré 486.1914.

5-Benzyl-3-pentylpyrano[4,3-*b*]indol-1(*5H*)-one (C36.02)

Rendement: 76%; solide incolore. Mp: 123-125 °C. IR (KBr): 3155, 3034-2872, 1793, 1713, 1626, 1608.

^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$): 0.88 (t, 3H, J = 6.4), 1.27-1.35 (m, 4H), 1.65_1.80 (m, 2H), 2.57 (t, 2H, J = 7.9), 5.38 (s, 2H), 6.29 (s, 1H), 7.03-7.12 (m, 3H), 7.27_7.35 (m, 6H), 7.97-8.03 (m, 1H).

^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$): 14.1, 22.5, 27.1, 31.3, 34.6, 47.7, 92.7, 99.6, 109.9, 121.4, 122.8, 124.5, 126.3, 128.2, 129.2, 135.7, 138.4, 146.7, 160.2, 164.5.

LRMS (ESI) 346 (M+H).

HRMS (ESI): calcul anal. pour $C_{23}H_{23}NO_2$ (M+H) 346.1729, mesuré 346.1736.

9-Benzyl-3-methoxymethylpyrano[3,4-*b*]indol-1(*9H*)-one (C36.04)

Rendement : 77%; solide incolore. Mp: 121-122 °C.

IR (KBr): 3069, 1698, 1626, 1615, 1212, 1084.

^{1}H RMN (300MHz, $CDCl_3$): 3.50 (s, 3H), 4.36 (d, 2H, J = 0.7), 5.90 (s,2H), 7.00 (s,1H), 7.20-7.32 (m, 6H), 7.45 - 7.50 (m, 2H), 7.90 (d, 1H, J = 8.0).
^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$): 48.0, 58.9, 71.0, 99.9, 111.5, 120.7, 121.3, 121.4, 121.7, 125.4, 127.1, 127.6, 128.1, 128.7, 137.4, 140.8, 152.3, 156.9.
MS (70 eV, EI) m/z (%) = 319 ($M^{\bullet+}$,68), 288 (27), 260 (8), 168 (11), 91 (100).
HRMS (ESI): calcul anal. pour $C_{20}H_{17}NO_3$ (M+H) 320.1281, mesuré 320.1276.

5-Benzyl-3-hydroxypropylpyran[4,3-*b*]indol-1(*5H*)-one C36.05

Rendement: 63%; solide orange. Mp: 149-151 °C.
IR (KBr): 3413, 2930-2860, 1694, 1559.
^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$): 1.71 (bs, 1H), 1.92-2.05 (m, 2H), 2.73 (t, 2H, J = 7.3), 3.71 (t, 2H, J = 6.1), 5.38 (s, 2H), 6.36 (s, 1H), 7.03-7.10 (m, 2H), 7.23-7.39 (m, 6H), 8.18-8.26 (m, 1H).
^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$): 30.3, 31.0, 47.3, 61.7, 93.2, 99.7, 110.0, 121.4, 122.9, 124.5, 124.7, 126.4, 128.2, 129.2, 135.7, 138.5, 146.6, 160.2, 163.6.
LRMS (ESI) 333 (M+H), 356 (M+Na); 372 (M+K).
HRMS (ESI): calcul anal. pour $C_{21}H_{19}NO_3$ (M+H) 333.1365, mesuré 333.1367.

Inhibition du développement d'*Eimeria tenella*

L'effet des composés C36, C36.02, C36.04 et C36.05 sur le développement du parasite *Eimeira tenella* est déterminé en observant leur incidence sur la différenciation des sporozoïtes en schizontes, qui constitue une étape clef du développement des parasites.

Préparation des cellules :

Des cellules MDBK (Madin-Darby bovine kidney) sont mises en culture en plaque 24 puits contenant des lamelles de verres, 24 h avant l'expérience. La concentration utilisée est de $1x10^5$ cellules par puits, dans du milieu Ham's F12 avec 5 % de SVF, 2 mM glutamine, 10 UI/mL pénicilline et 10 µg/mL streptomycine.
Les cellules sont ensuite placées dans une étuve à 41°C en atmosphère contenant 5% de CO_2.

Préparation des parasites :

Des parasites exprimant le gène de la Yellow Fluorescent Protein (YFP) sont purifiés à partir d'oocystes comme décrit par Rieux *et al*, Plos One 2012.

Les oocystes sporulés sont broyés mécaniquement à l'aide de billes de verre de 0,5 mm. Les parasites sont centrifugés à 800 g, 5 min, 20°C et lavés 3 fois en PBS pour éliminer les débris de parois. Les sporocystes sont ensuite incubés dans un milieu d'excystation (Sels biliaires 0,5 %, Trypsine 0,25 % dilué en PBS pH 7,6) à 41°C pendant 75 minutes. Les sporozoïtes sont purifiés par deux étapes de filtration, la première sur du coton puis sur un filtre de polycarbonate de 5 µM (GE Water &ProcessTechnology).

Préparation des composés :

Les composés C36, C36.02, C36.04 et C36.05 sont dissous dans du DMSO (Diméthylsulfoxyde) à une concentration de 10 mM.

Infection des cellules :

Les parasites ($2x10^5$) sont mis au contact des cellules ($1x10^5$) en même temps que le composé à tester (C36, C36.02, C36.04 ou C36.05) dans un volume final de 500 µL par puits. Pour chaque composé testé, le test est réalisé en double dans 2 puits différents. Un témoin (réalisés en double dans 2 puits) sert de témoin de développement. Il est constitué des parasites et des cellules sans ajout de composé à tester. Un autre témoin (également en double) est utilisé pour tester la toxicité du DMSO dans lequel sont dissouts les composés à tester. Il est constitué des cellules, des parasites et du solvant (DMSO) à la concentration maximale utilisée pour l'expérimentation.

Les cellules sont ensuite placées dans une étuve à 41°C en atmosphère contenant 5 % de CO_2.

Le milieu de culture est changé deux fois par jour à partir de 16 h p.i.(Post-infection), les inhibiteurs sont renouvelés en même temps que le milieu.

Observation des parasites en absence et en présence du composé C36:

Les cellules sont lavées et fixées à l'Antigène fixe à 48 h p.i.. Les lamelles sont ensuite mises en contact avec du milieu de montage (Vectashield) contenant du DAPI avant d'être sellées.

Les résultats sont présentés à la figure 1. Il peut être observé qu'en présence du composé C36, le nombre de schizontes observés (B) est plus faible.

Calcul du pourcentage d'invasion:

Dans un premier temps, le pourcentage d'invasion est calculé. Trois comptages sont effectués pour déterminer le nombre de cellules et le nombre de parasite total (sporozoïtes + schizontes).

Formule : **(Nb parasites / Nb cellules) *100**

Calcul du pourcentage de développement :

Pour déterminer le pourcentage de développement, il est nécessaire de comparer le nombre de parasite total et le nombre de schizontes présents.

Formule : **(Nb schizontes / Nb parasites) * 100**

Les effets des composés sur l'invasion et le développement des parasites sont présentés aux figures 2 et 3.

La figure 2 met en évidence une inhibition dose dépendante du développement des parasites par le composé C36. Il peut être observé que le composé C36 n'inhibe pas l'invasion mais inhibe fortement la différenciation des sporozoïtes en schizontes.

La figure 3 présente les effets des composés C36, C36.02, C36.04 et C36.05 sur l'invasion et le développement par rapport au contrôle. Il peut être observé que chacun des composés testés inhibe fortement la différenciation des sporozoïtes en schizontes sans influencer l'invasion.

Inhibition du développement de *Toxoplasma gondii*

L'effet de composés chimiques sur le développement du parasite *Toxoplasma gondii* est déterminé en observant leur incidence sur la formation de plages de lyses qui illustre la multiplication de parasite sur un tapis cellulaire.

Préparation des cellules :

Des cellules HFF (Human Foreskin Fibroblast) sont mises en culture en plaque 6 puits pour être à confluence au moment de l'expérimentation. Les cellules sont dans du milieu DMEM avec 10 % de SVF, 2 mM glutamine, 10 U/mL péniciline et 10 µg/mL de streptomycine.

Les cellules sont ensuite placées dans une étuve à 37°C en atmosphère contenant 5% de CO_2

Préparation des parasites :

Les tachyzoites de *Toxoplasma gondii* sont maintenus en routine sur des cultures de HFF cultivées dans du milieu DMEM (voir ci-dessus). Avant la mise en contact sur les cellules

HFF les parasites sont filtrés avec un filtre de polycarbonate de 5µM (GE Water & Process Technology)

Préparation des composés :

Les composés à tester sont dissous dans du DMSO (Diméthylsulfoxyde) à une concentration de 10mM.

Infection des cellules :

Les parasites ($1x10^4$/puits) sont déposés sur les cellules à confluence en même temps que le composé à tester dans un volume final de 3mL par puits. Pour chaque composé, le test est réalisé en double dans deux puits différents. Un contrôle sans composé (réalisé en double dans 2 puits différents) sert de témoin de développement. Il est uniquement composé des cellules et des parasites. Un autre témoin (également en double) est testé pour vérifier l'absence d'effet néfaste du DMSO sur le développement. Il est constitué des cellules, des parasites et du solvant (DMSO) à la concentration maximale utilisée pour l'expérimentation. Après ajout des parasites et des composés, les cellules sont placées dans une étuve à 41°C en atmosphère contenant 5% de CO_2.

Le milieu de culture ne doit pas être changé et la plaque ne doit pas être déplacée pendant toute la durée de l'infection

Marquage des HFFs et révélation des plages de lyses :

Les cellules sont fixées au méthanol froid (conservé à -20°C) pendant 5 minutes. Les cellules sont ensuite lavées au PBS avant d'être colorées au Crystal Violet pendant 1 à 5 minutes. Les plaques sont lavées abondamment pour enlever l'excédent de colorant et sont séchées à l'air libre. Les plages de lyses reflétant le développement de *Toxoplasma* vont apparaitre comme des plages claires sur le fond violet des HFFs. Une diminution du développement du parasite entraîne une diminution du nombre de plages observées et de leurs superficies.

Calcul de la superficie des plages de lyses :

La superficie des plages de lyses est calculée par l'utilisation d'un logiciel de traitement d'image de microscopie (Zeiss Axiovision). La superficie moyenne est calculée pour chaque condition et est exprimée comme le pourcentage de la moyenne d'une condition par rapport au contrôle sans inhibiteur avec son écart type.

Les résultats sont présentés aux figures 4A et 4B qui mettent en évidence la diminution dose dépendante de la surface des plages de lyses illustrant le développement du parasite *Toxoplasma gondii*.

Inhibition du développement de *Plasmodium falciparum*

Les travaux sur *P. falciparum* ont été réalisés par Henri Vial et son équipe (UMR 5235, Dynamique des Interactions Membranaires Normales et Pathologiques, CNRS Université Montpellier II, Case 107, Place Eugene Bataillon, 34095 Montpellier, Cedex 05, France). L'effet des composés chimiques sur le développement du parasite *Plasmodium falciparum* est déterminé *in vitro* en évaluant leur activité contre ce parasite après 48h de culture de contact (soit le temps d'un cycle de *P. falciparum*). Cette activité pharmacologique est évaluée par incorporation par le parasite d'hypoxanthine tritiée et est confirmée par microscopie optique après coloration au Giemsa.

Préparation des parasites et des cellules :

L'effet du composé C36 sur la croissance *in vitro* de *Plasmodium falciparum* est mesuré sur des érythrocytes en suspension infectés par la souche *P. falciparum* 3D7 (1,5% d'hématocrite finale et 0,6% de parasitémie) en micro-plaques 96 puits comme décrits par Desjardins et al (Dejardins, 1979). Le volume de chaque puit est de 200µL final de milieu de culture complet CM (RPMI 1640 25 mM Hepes + 10% de sérum humain AB) sans (Contrôle) ou en présence du composé C36. La culture est mise en étuve pendant 48h à 37°C.

Préparation des composés :

Le composé C36 a été dissous dans du DMSO (Diméthylsulfoxyde). La concentration finale de DMSO ne dépasse jamais 0,25%.

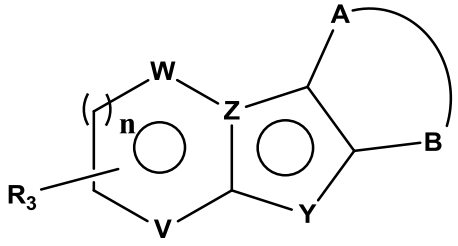
Evaluation des effets anti-malaria :

Après les 48h de cultures, 30µL de milieu complet contenant 0,6µCi [^{3}H]-hypoxanthine sont ajoutés dans chaque puits. Les plaques sont incubées pendant 18h à 37°C. Les cellules sont ensuite lysées et les macromolécules parasitaires, incluant les acides nucléiques radioactifs sont récupérés avec des filtres de fibre de verre. Un cocktail de scintillation est ajouté et la radioactivité des filtres est évaluée en phase liquide par un spectromètre de scintillation.

Le bruit de fond de radioactivité est obtenu par l'incubation de cellules non infectée dans les mêmes conditions que précédemment. L'effet antiparasitaire est exprimé comme l'IC_{50}, dose à laquelle la drogue entraine une inhibition de 50% du développement parasitaire. Les résultats sont présentés à la figure 5. L'IC_{50} du composé C36 contre la croissance de *Plasmodium falciparum* après 48 h de contact (un temps de cycle) est de 14 micromolaires.
L'activité antiparasitaire est confirmée par examen de frottis colorié au Giemsa.

REVENDICATIONS

1. Composés de formule (I) :



(I)

dans laquelle :

- -**A**-**B**- représente -CO-O-C$\mathbf{R_1}$=C- ou –C=C$\mathbf{R_1}$-**X**-CO-
  - avec **X** représentant un atome d'oxygène ou d'azote ;
  - avec $\mathbf{R_1}$ représentant un groupement alkyle, alcényle, alcynyle, aryle, hétéroaryle ou cycolalkyle, ledit groupement alkyle, alcényle, alcynyle, aryle, hétéroaryle ou cycolalkyle pouvant être substitué, ou non, par un ou plusieurs groupement(s) hydroxyle, halogène, alkyle, alcényle, alcynyle, alkyloxy, alkylthio, amino, nitro, cycloalkyle, aryle, hétéroaryle, ester et/ou cétone ;
- **Y** représente un atome d'azote substitué, ou non, par un groupement $\mathbf{R_2}$ avec $\mathbf{R_2}$ représentant un atome d'hydrogène, un groupement alkyle, aryle, arylalkyle, hétéroaryle, alkylcarbonyle, arylcarbonyle ou hétéroarylcarbonyle ;
- **Z** représente un atome de carbone ou d'azote ;
- **W** représente un atome de carbone ou d'azote, à la condition que lorsque **W** est un atome d'azote, **Z** est un atome d'azote et **V** est un atome de carbone substitué par $\mathbf{R_3}$;
- **n** représente le nombre entier 0 ou 1 ;
- **V** représente un atome de carbone ou de soufre, à la condition que lorsque **V** est un atome de soufre, **n** est égal à 0, Z est un atome d'azote et **W** est atome de carbone ;
- $\mathbf{R_3}$ représente un hydrogène, un groupement alkyle, alcényle, alcynyle, alkylthio, arylthio, alkyloxy, aryloxy, aryle, hétéroaryle, amino ou un halogène ;

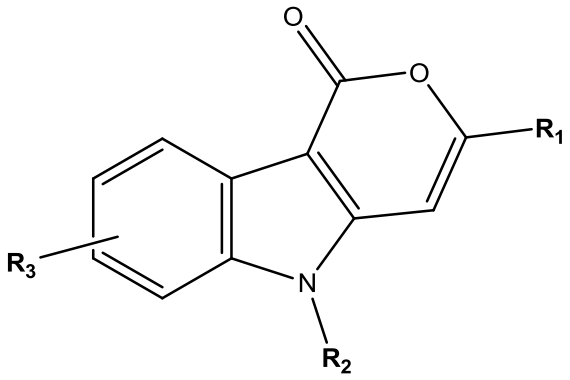
pour utilisation dans la prévention et/ou le traitement des parasitoses induites par des parasites appartenant au phylum des apicomplexes.

2. Composés pour utilisation selon la revendication 1 dans laquelle les parasitoses sont choisies parmi les coccidioses, la malaria, la toxoplasmose, la néosporose ou la cryptosporidiose.

3. Composés pour utilisation selon la revendication 2 dans laquelle les coccidioses sont choisies parmi les coccidioses aviaires, bovines, porcines ou ovines.

4. Composés pour utilisation selon l'une des revendications précédentes, caractérisés en ce que lesdits composés présentent la formule (I) dans laquelle **V**, **W** et **Z** représentent un atome de carbone, **Y** représente un atome d'azote substitué par un groupement $\mathbf{R_2}$ et n est égal à 1.

5. Composés pour utilisation selon l'une des revendications précédentes, caractérisés en ce que lesdits composés présentent la formule (IV) :

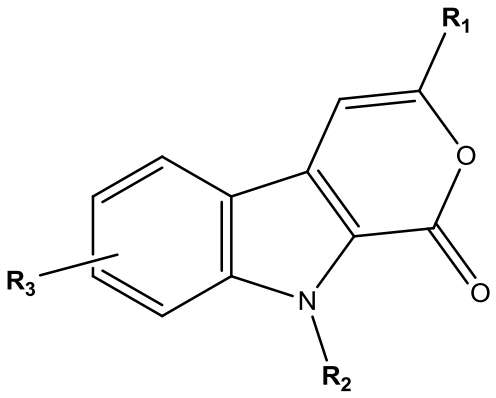


(IV)

dans laquelle :

- $\mathbf{R_1}$ représente un groupement alkyle, alcényle, alcynyle, aryle, hétéroaryle ou cycolalkyle, ledit groupement alkyle, alcényle, alcynyle, aryle, hétéroaryle ou cycolalkyle pouvant être substitué, ou non, par un ou plusieurs groupement(s) hydroxyle, halogène, alkyle, alcényle, alcynyle, alkyloxy, alkylthio, amino, nitro, cycloalkyle, aryle, hétéroaryle, ester et/ou cétone ;
- $\mathbf{R_2}$ représente un groupement alkyle, aryle, arylakyle, hétéroaryle, alkylcarbonyle, arylcarbonyle ou hétéroarylcarbonyle ;
- $\mathbf{R_3}$ représente un hydrogène, un groupement alkyle, alcényle, alcynyle, arylthio, alkylthio, aryloxy, alkyloxy, aryle, hétéroaryle, amino ou un halogène.

6. Composés pour utilisation selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisés en ce que lesdits composés présentent la formule (V) :



(V)

dans laquelle :

- **R_1** représente un groupement alkyle, alcényle, alcynyle, aryle, hétéroaryle ou cycolalkyle, ledit groupement alkyle, alcényle, alcynyle, aryle, hétéroaryle ou cycolalkyle pouvant être substitué, ou non, par un ou plusieurs groupement(s) hydroxyle, halogène, alkyle, alcényle, alcynyle, alkyloxy, alkylthio, amino, nitro, cycloalkyle, aryle, hétéroaryle, ester et/ou cétone ;

- **R_2** représente un groupement alkyle, aryle, arylalkyle, hétéroaryle, alkylcarbonyle, arylcarbonyle ou hétéroarylcarbonyle ;

- **R_3** représente un hydrogène, un groupement alkyle, alcényle, alcynyle, alkylthio, alkyloxy, aryle, hétéroaryle, amino ou un halogène.

7. Composés pour utilisation selon l'une des revendications précédentes, caractérisés en ce que lesdits composés présentent la formule (I), (IV) ou (V) dans laquelle **R_1** représente :

- un groupement alkyle ou alcényle comprenant de 1 à 6 atomes de carbone, substitué, ou non, par un ou plusieurs groupement(s) hydroxyle, alkyloxy, ester, alcyne et/ou cycloalkyle ;

- un groupement phényle ;

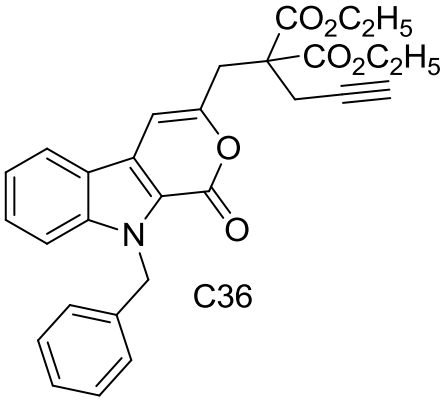
- un groupement phényle substitué en ortho, méta ou para par un groupement alkyle comprenant de 1 à 3 atomes de carbone, halogène, alkyloxy, alkylthio, nitro, amino ; ou

- un groupement thiophène ou pyridine.

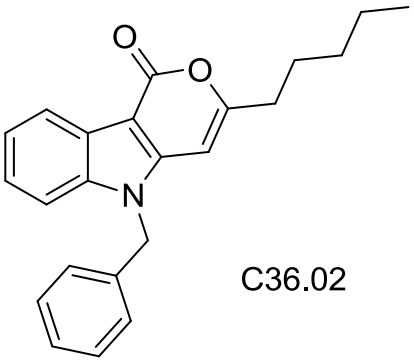
8. Composés pour utilisation selon l'une des revendications précédentes, caractérisés en ce que lesdits composés présentent la formule (I), (IV) ou (V) dans laquelle $\mathbf{R_2}$ représente un groupement benzyle.

9. Composés pour utilisation selon l'une des revendications précédentes, caractérisés en ce que lesdits composés présentent la formule (I), (IV) ou (V) dans laquelle $\mathbf{R_3}$ représente un hydrogène.

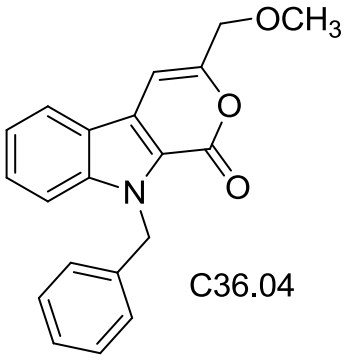
10. Composés pour utilisation selon l'une des revendications précédentes choisis parmi :



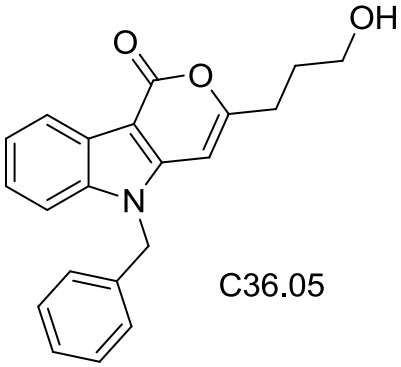
C36



C36.02



C36.04



C36.05

11. Composition pharmaceutique ou vétérinaire comprenant au moins un composé de formule (I) tel que décrit dans l'une des revendications 1 à 10 et au moins un excipient acceptable.

12. Composition pharmaceutique ou vétérinaire selon la revendication 11 pour utilisation dans la prévention et/ou le traitement des parasitoses induites par des parasites appartenant au phylum des apicomplexes.

13. Composition pharmaceutique ou vétérinaire selon la revendication 11 ou 12 comprenant en outre un agent antiparasitaire.

14. Composition pharmaceutique ou vétérinaire selon l'une des revendications 11 à 13 destinée à être administrée par voie orale.

15. Combinaison comprenant au moins un composé de formule (I) tel que décrit dans l'une des revendications 1 à 10 et au moins un agent antiparasitaire.

ABREGE DESCRIPTIF

La présente invention concerne des composés appartenant à la classe des pyranones utiles dans la prévention et/ou le traitement des coccidioses (infections par *Eimeria spp.*). Ces composés s'avèrent également utiles dans la prévention et/ou le traitement de la cryptosporidiose (infections par *Cryptosporidium spp.)*, de la toxoplasmose (infections par *Toxoplasma gondii*), de la néosporose (infections induites par *Neospora caninum*) et/ou de la malaria (infections par *Plasmodium spp.*).

Annexe 4 : L’eimeripaïne, une protéase homologue de la cathepsine B, est exprimée pendant la sporulation du parasite apicomplexe *Eimeria tenella*

OPEN ACCESS Freely available online

PLoS one

Eimeripain, a Cathepsin B-Like Cysteine Protease, Expressed throughout Sporulation of the Apicomplexan Parasite *Eimeria tenella*

Anaïs Rieux[1,2¤], Simon Gras[1,2], Fabien Lecaille[3], Alisson Niepceron[1,2], Marilyn Katrib[4], Nicholas C. Smith[5], Gilles Lalmanach[3], Fabien Brossier[1,2]*

1 INRA, UMR1282, Equipe Pathogenèse des Coccidioses, Infectiologie et Santé Publique, Nouzilly, France, **2** Université François Rabelais de Tours, UMR1282, Infectiologie et Santé Publique, Tours, France, **3** INSERM U618, Protéases et Vectorisation Pulmonaires, Université François Rabelais, Tours, France, **4** Institute for the Biotechnology of Infectious Diseases, University of Technology, Sydney, Australia, **5** Queensland Tropical Health Alliance, Faculty of Medicine, Health and Molecular Sciences, James Cook University, Cairns, Australia

Abstract

The invasion and replication of *Eimeria tenella* in the chicken intestine is responsible for avian coccidiosis, a disease that has major economic impacts on poultry industries worldwide. *E. tenella* is transmitted to naïve animals via shed unsporulated oocysts that need contact with air and humidity to form the infectious sporulated oocysts, which contain the first invasive form of the parasite, the sporozoite. Cysteine proteases (CPs) are major virulence factors expressed by protozoa. In this study, we show that *E. tenella* expresses five transcriptionally regulated genes encoding one cathepsin L, one cathepsin B and three cathepsin Cs. Biot-LC-LVG-CHN_2, a cystatin derived probe, tagged eight polypeptides in unsporulated oocysts but only one in sporulated oocysts. CP-dependant activities were found against the fluorescent substrates, Z-FR-AMC and Z-LR-AMC, throughout the sporulation process. These activities corresponded to a cathepsin B-like enzyme since they were inhibited by CA-074, a specific cathepsin B inhibitor. A 3D model of the catalytic domain of the cathepsin B-like protease, based on its sequence homology with human cathepsin B, further confirmed its classification as a papain-like protease with similar characteristics to toxopain-1 from the related apicomplexan parasite, *Toxoplasma gondii*; we have, therefore, named the *E. tenella* cathepsin B, eimeripain. Following stable transfection of *E. tenella* sporozoites with a plasmid allowing the expression of eimeripain fused to the fluorescent protein mCherry, we demonstrated that eimeripain is detected throughout sporulation and has a punctate distribution in the bodies of extra- and intracellular parasites. Furthermore, CA-074 Me, the membrane-permeable derivative of CA-074, impairs invasion of epithelial MDBK cells by *E. tenella* sporozoites. This study represents the first characterization of CPs expressed by a parasite from the *Eimeria* genus. Moreover, it emphasizes the role of CPs in transmission and dissemination of exogenous stages of apicomplexan parasites.

Citation: Rieux A, Gras S, Lecaille F, Niepceron A, Katrib M, et al. (2012) Eimeripain, a Cathepsin B-Like Cysteine Protease, Expressed throughout Sporulation of the Apicomplexan Parasite *Eimeria tenella*. PLoS ONE 7(3): e31914. doi:10.1371/journal.pone.0031914

Editor: John Parkinson, Hospital for Sick Children, Canada

Received October 21, 2011; **Accepted** January 17, 2012; **Published** March 22, 2012

Copyright: © 2012 Rieux et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Funding came from the French National Institute for Agricultural Research. The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: fbrossier@tours.inra.fr

¤ Current address: ANSES, laboratoire d'Etude et de Recherche Caprine, Niort, France

Introduction

Eimeria spp. are enteropathogens that infect a variety of mammals and birds. Avian coccidiosis is caused by the infection of chicken with extremely well adapted *Eimeria spp.* These infectious diseases lead to major economic losses worldwide in poultry industries. Anticoccidial drugs are used extensively to control the disease but the increase of resistant parasite populations underlines the need to find alternative targets and drugs.

The genus, *Eimeria*, belongs to the phylum Apicomplexa, a group of medically and economically important parasites including *Plasmodium spp.* (agents of malaria) and *Toxoplasma gondii* (the agent of toxoplasmosis). Among the seven species of *Eimeria* commonly detected in infected chickens, *Eimeria tenella* is one of the most virulent and the only one for which the genome has been sequenced (http://www.genedb.org/Homepage/Etenella) [1]. As for other Coccidia, the complex life cycle of *E. tenella* is divided into an intestinal and an environmental stage. The intestinal stage involves the invasion and replication of parasites within epithelial cells of the chicken intestine, followed by production of male and female gametes, fertilisation and formation of unsporulated oocysts, which are released into the environment. The environmental stage involves maturation, also called sporulation, of unsporulated oocysts into infectious sporulated oocysts. Each sporulated oocyst contains eight haploid sporozoites, the first invasive form of the parasite.

Cysteine cathepsins related to papain-like enzymes, (clan CA, family C1) are major virulence factors expressed by parasites, including apicomplexan parasites ([2] and see the MEROPS database - http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/clan_index?type=P). Thus, several studies have revealed the crucial roles of cysteine cathepsins

(including cathepsin B- and L-like proteases) in cell invasion [3], [4], [5], nutrient acquisition [6], [7], [8], replication and egress [9], [10] by apicomplexan parasites. Cysteine cathepsins may also play a role in the biology of sexual stages and/or the development of oocyst [11] since, for example, a *falcipain-1* knock-out strain of *Plasmodium falciparum* is not affected in its capacity to replicate within the erythrocyte but is impaired in its capacity to produce oocysts [12]. It is also known that, in oocysts of *Eimeria*, an orthologue of a *T. gondii* cathepsin B, toxopain-1 [13], as well as an aminopeptidase [14], [15], and a serine protease from the rhomboid family [16] are all expressed at various times during sporulation of oocysts, though a definitive role for proteases in this process has not been demonstrated.

In this study, we describe the biochemical and molecular characterization of CPs expressed in the environmental oocyst stages of *E. tenella* as it undergoes sporulation and produces the invasive sporozoite stage. We have specifically identified a cathepsin B-like protease and investigated its expression profile, biochemical properties, localization and role in cell invasion.

Results

Identification and expression profile of CP genes expressed by *E. tenella*

Five putative CP genes including one *cathepsin B* (this work, Accession no JN641867, on Supercontig_23), one *cathepsin L* (*etcpl*, on contig NODE_2923_length_1315_cov_12.253232), and three *cathepsin Cs* (*etcpc1*, ETH_00019755 on Supercontig_2; *etcpc2*, ETH_0005000, on contig NODE_22022_length_2554_cov_8.124119; and *etcpc3*, ETH_00001590, ETH_00001595, ETH_00001600, on Supercontig_115) were identified using BLASTP to search the *E. tenella* genome database (http://www.genedb.org/Homepage/Etenella) using, as queries, the putative homologs described in other apicomplexan parasites, namely *T. gondii* and *P. falciparum*.

To begin addressing the biological roles of these proteases, we examined their expression patterns by RT-PCR on total RNAs from three different time points of oocyst sporulation: unsporulated (0 h of sporulation); partially sporulated (6 h of sporulation); and fully sporulated (48 h) (Figure 1). Expression of actin was assessed as a control and, whilst expressed at every time point tested, it was noticeable that actin expression appeared to be downregulated significantly during sporulation with expression being upregulated again in fully sporulated oocysts (Figure 1). This is totally consistent with previous findings [17]. A cathepsin L (EtCPL) and two cathepsin Cs (EtCPC2 and EtCPC3) were mainly expressed in unsporulated oocysts and partially sporulated oocysts. In contrast, a third cathepsin C (EtCPC1) appeared to be expressed in fully sporulated oocysts only. A cathepsin B-like enzyme (EtCPB) was the only protease expressed throughout sporulation, though it was more strongly expressed in unsporulated oocysts and at the earliest time point of sporulation (Figure 1).

Biochemical characterization of a cathepsin B-like activity in oocyst lysates

To analyze the putative activities of CPs during sporulation, we performed a biochemical assay on oocyst lysates taken 0, 6, 12, 24, 36 and 48 h after the commencement of sporulation. Each lysate was incubated with the fluorescent substrates, Z-FR-AMC, Z-LR-AMC (Figure 2). Z-FR-AMC and Z-LR-AMC are substrates for both cathepsin B and cathepsin L-like enzymes, shown to be expressed by *E. tenella* (Figure 1). These dipeptides are cleaved by active cysteine endopeptidases at the C-terminus of the arginine residue resulting in the release of AMC. Free AMC emits a fluorescent signal that can be quantified by spectrofluorimetry [18], [8], [19]. Proteolytic activities towards Z-FR-AMC that corresponded to active cysteine proteases were detected in each oocyst lysate along the oocyst maturation. The emitted fluorescence was linear with time. These activities increased until 12 h of sporulation to reach a plateau that persisted in fully sporulated oocysts (Figure 2A). Pre-incubation of unsporulated oocyst lysate with the broad-spectrum cysteine protease inhibitor, E-64, resulted in a greatly reduced signal, thus confirming that cysteine proteases were responsible for the activities observed on Z-FR-AMC. Similarly, unsporulated and sporulated oocysts showed activities on Z-LR-AMC and these activities were inhibited by E-64 (Figure 2B). These data demonstrated that a single or several CPs were active during sporulation, suggesting a role in this crucial step of the *Eimeria* life cycle. Since the analysis of the expression profile of *Eimeria* CPs revealed that an mRNA encoding a cathepsin B-like protease was expressed both in unsporulated and sporulated oocysts, we investigated the contribution of this enzyme to the observed activities on Z-FR-AMC and Z-LR-AMC (Figure 2B). Unsporulated and sporulated oocyst lysates were pre-incubated with CA-074, a specific inhibitor of human cathepsin B, before adding the substrates. The inhibitor completely abolished the activities on both substrates in each lysate. In addition, we detected an activity of the unsporulated oocyst lysate on the specific cathepsin B-like substrate Z-RR-AMC ($\Delta FU/min = 6700 +/- 1500$). Taken together, these data demonstrated that a cathepsin B-like protease was expressed, and was the only activity detected throughout sporulation.

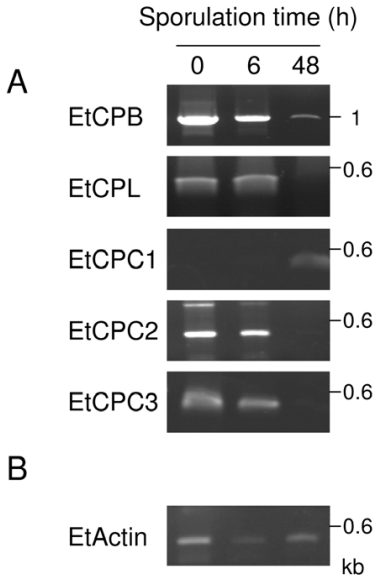


Figure 1. Expression profile of CPs in *E. tenella*. (A) Total RNAs from unsporulated oocysts (0), oocysts in sporulation for 6 h (6) and fully sporulated oocysts (48) were extracted and RT-PCR were performed using specific primers to *etcpb, etcpl, etcpc1, etcpc2* and *etcpc3*. (B) The single-copy *actin* gene was amplified in parallel as a control (*etactin*). The down regulation of *etactin* during sporulation has been previously described [17]. The RT-PCR products were resolved on a 0.7% agarose gel stained with ethidium bromide. The band observed at 0.8 kb with primers specific to *etcpc2* and total RNAs from unsporulated oocyst (0) is a nonspecific amplification product.
doi:10.1371/journal.pone.0031914.g001

Activity profile of CPs throughout sporulation

We performed a biochemical assay based on the interaction between proteases and the activity-based probe Biot-LC-LVG-

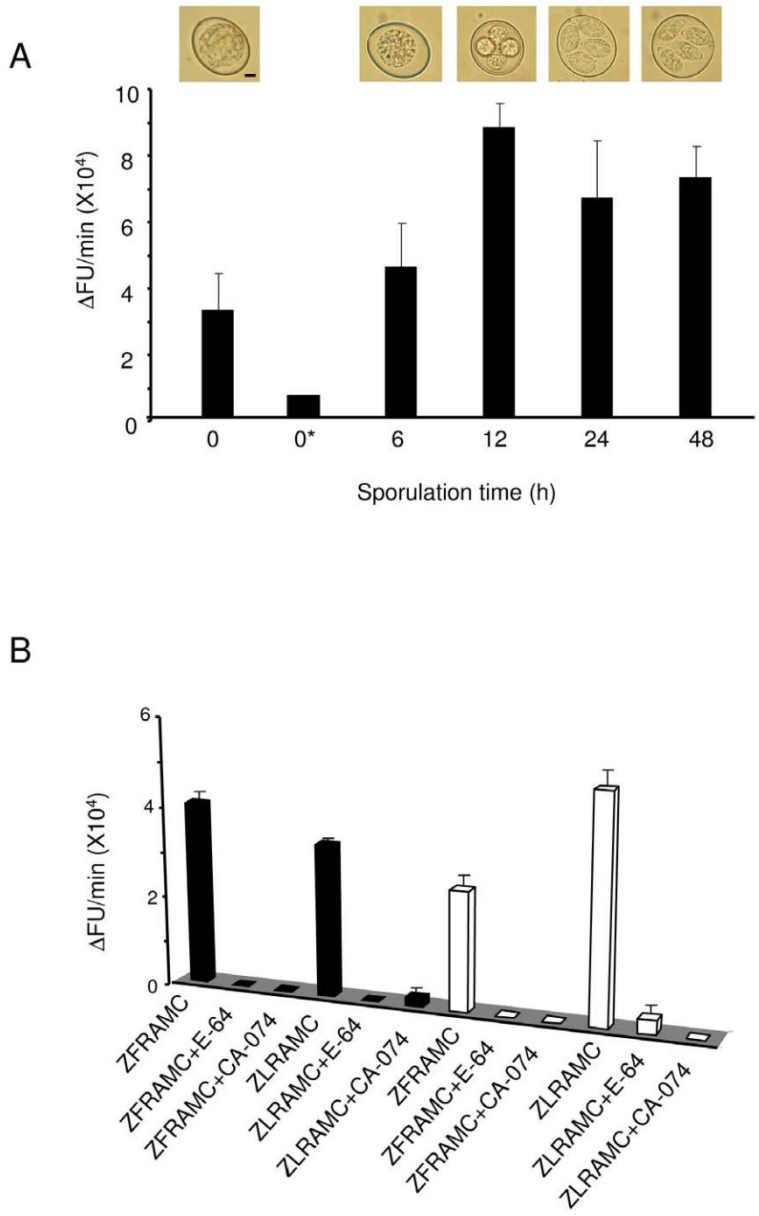


Figure 2. Biochemical activities of CPs throughout sporulation. (A) Activities detected on Z-FR-AMC. Lysates of oocysts (1 mg/ml) taken at 0, 6, 12, 24 and 48 h after the beginning of sporulation were incubated with the substrate Z-FR-AMC (10 μM). The morphology of oocysts (under light microscopy) throughout the course of sporulation is shown. The scale bar represents 2 μm. (B) Activities detected on Z-FR-AMC and Z-LR-AMC in presence of the global cysteine protease inhibitor E-64 or the human cathepsin B specific inhibitor CA-074. Lysates (1 mg/ml) of oocysts taken at 0 h (black bars) and 48 h (white bars) after commencement of sporulation were pre-incubated with the inhibitors before adding the substrates. The data represents two independent experiments.
doi:10.1371/journal.pone.0031914.g002

CHN_2. This compound is derived from the N-terminal substrate-like sequence of human cystatin and has been shown previously to interact specifically with the nucleophilic cysteine of the catalytic sites of CPs expressed by *Trypanosoma cruzi* and *P. falciparum*, cruzipain or falcipains, respectively [20], [21]. The biotin group allows the direct detection of CPs in the presence of streptavidin peroxidase. Lysates of unsporulated, partially sporulated and fully sporulated oocysts were incubated with Biot-LC-LVG-CHN_2 and the complexes formed with *Eimeria* CPs were analyzed (Figure 3). Up to eight main complexes were revealed in the lysates of unsporulated oocysts. They corresponded to proteins of 33, 35, 36, 38, 44, 46, 50 and 55 kDa. Remarkably, 6 h after the beginning of

sporulation, the majority of signal intensities decreased dramatically except for the one corresponding to the 33 kDa band (Figure 3A). Moreover, this unique band of a constant intensity persisted until the completion of sporulation. Next, we used specific inhibitors to identify the proteases revealed by the probe (Figure 3B). Addition of E-64 to the unsporulated oocyst lysate, before incubation with the probe, resulted in the complete or drastic loss of the signals demonstrating the specific interaction between Biot-LC-LVG-CHN$_2$ and CPs expressed by *E. tenella*. To determine if cathepsin B activity was detected by the probe, unsporulated and sporulated oocyst lysates were pre-incubated with CA-074 before adding the probe Biot-LC-LVG-CHN$_2$. Addition of CA-074 specifically inhibited the 33 kDa corresponding activity. This data revealed that the 33 kDa band that persisted throughout sporulation corresponded to *E. tenella* cathepsin B.

Amino acid alignment of *E. tenella* cathepsin B with parasitic, mammalian and bird cathepsin B

We cloned and sequenced the gene encoding the *E. tenella* cathepsin B. An alignment of the amino acid sequence of this enzyme with toxopain-1 (cathepsin B expressed by *T. gondii*), human cathepsin B and chicken cathepsin B was performed (Figure 4). The *E. tenella* cathepsin B is a 512 amino acid protein composed of a signal peptide (from Met1 to Ala21) identified by signalP, a predicted prodomain (from Met22 to Pro223) and a catalytic domain (from Leu224 to Leu512). The prodomain is much longer (214 amino acids) than mammalian and bird cathepsin B, as also reported for toxopain-1 [3]. The *E. tenella* cathepsin B contains the two archetypal residues (Cys266 and His445) that form the thiolate-imidazolium ion pair and are

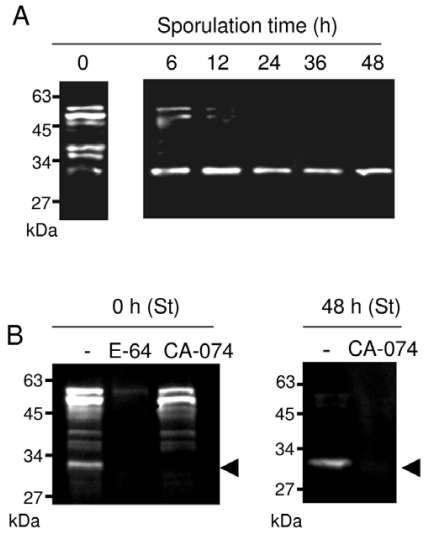


Figure 3. Profile of active CPs throughout sporulation. (A) Lysates of unsporulated oocysts (0) and oocysts in sporulation for 6, 12, 24, 36 and 48 h were incubated with the probe Biot-LC-LVG-CHN$_2$. The complexes were revealed by Western blot using streptavidin peroxidase. (B) Lysates of oocysts obtained at 0 h or 48 h of sporulation time (St) were pre-incubated or not (−) with E-64 (28 μM) or CA-074 (100 μM) before addition of Biot-LC-LVG-CHN$_2$. The interaction between the probe and CP catalytic sites was detected by Western blot using streptavidin peroxidase. The arrowhead indicates the activity corresponding to the *E. tenella* cathepsin B (33 kDa).
doi:10.1371/journal.pone.0031914.g003

involved in the nucleophilic attack of the peptidyl substrate as well an asparaginyl residue (Asn465) reported to critically support the catalytic mechanism. C266 is embedded in the highly conserved peptide sequence, CGSC266WAF. Specific cathepsin B motifs are also found in the *E. tenella* sequence including the G308CXGG motif as well as the residues that form the occluding loop, which is characterized by two adjacent histidine residues (His352, His353) and encompasses amino acid residues Pro344 to Cys371. In addition to its endopeptidase activity, the presence of the occluding loop confers, specifically to cathepsin B, a dipeptidyl carboxypeptase activity [22] as well as a poor inhibitory potential towards kininogens compared to stefins and cystatins [23].

Molecular modelling of *E. tenella* cathepsin B

The structure of the *E. tenella* cathepsin B was determined by molecular replacement using the structure of the catalytic domain of human cathepsin B, with which it shares 43.1% sequence identity. Eimeripain exhibits the typical papain-like fold that is representative of the cysteine cathepsin family (Clan CA, family C1). It is composed of two domains, referred to as the left (L-) and right (R-), in accordance with the standard view and nomenclature (See for review, [24]), [25]. Thus, the left domain has three helical regions, the right domain is composed of a barrel of six strands, which includes a shorter α helical motif, and the catalytic triad is housed in a cleft separating the two domains, with Cys266 located in the left domain and His445 and Asn465 (*E. tenella* numbering) provided by the right domain (Figure 5). The *E. tenella* structure clearly resembles cathepsin B-type peptidases with the insertion of the so-called occluding loop, between the conserved Pro-Tyr345 motif and Cys371. The loop is characterized by two adjacent histidine residues (His352, His353), which block the active site cleft on the primed binding site (beyond S'2 subsite) and are responsible for the dipepdityl carboxypeptidase activity of cathepsin B. A comparison of the homology-based model with human cathepsin B shows a high degree of similarity (rmsd 0.49 Å for 245 Cα atoms). The major structural changes in backbone superposition correspond to additional residues and localize at the surface exposed loops including residues Asn334-Ser341, Glu377-Lys383 and Asp389-Thr395. We have, based on its susceptibility to specific inhibitors, its sequence homology and the predicted 3D structure, named the *E. tenella* cathepsin B, eimeripain.

Localization of eimeripain in oocysts and sporozoites

The recent advances in the development of transgenesis in *E. tenella* allows, for the first time, consideration of knock-in and knock-out strategies to determine the function of genes in the biology of the parasite [26], [27]. To localize eimeripain within the parasite, we used a stable transfection strategy to make the parasite express a tagged version of eimeripain (Figure 6). The fusion protein, eimeripain_mCHER, consisted of eimeripain fused, in frame, to its C-terminus with the fluorescent protein mCherry (red). The endogenous promoter of eimeripain was chosen to drive the expression of eimeripain_mCHER to maintain regulation of expression similar to that observed with the endogenous *eimeripain* gene. In a first set of experiments, we looked at the localization of the fusion protein within the unsporulated and sporulated oocysts (Figure 6A). Recombinant unsporulated oocysts expressed eimeripain_mCHER and the protein was uniformly distributed in the zygote. In contrast, in the sporulated oocysts, eimeripain_mCHER had a punctate distribution within sporozoites. In a second set of experiments, we analyzed the localization of the tagged protease within extracellular (Figure 6B) and intracellular (Figure 6C) sporozoites. In both conditions, eimeripain_mCHER was observed as several dots in the parasite bodies.

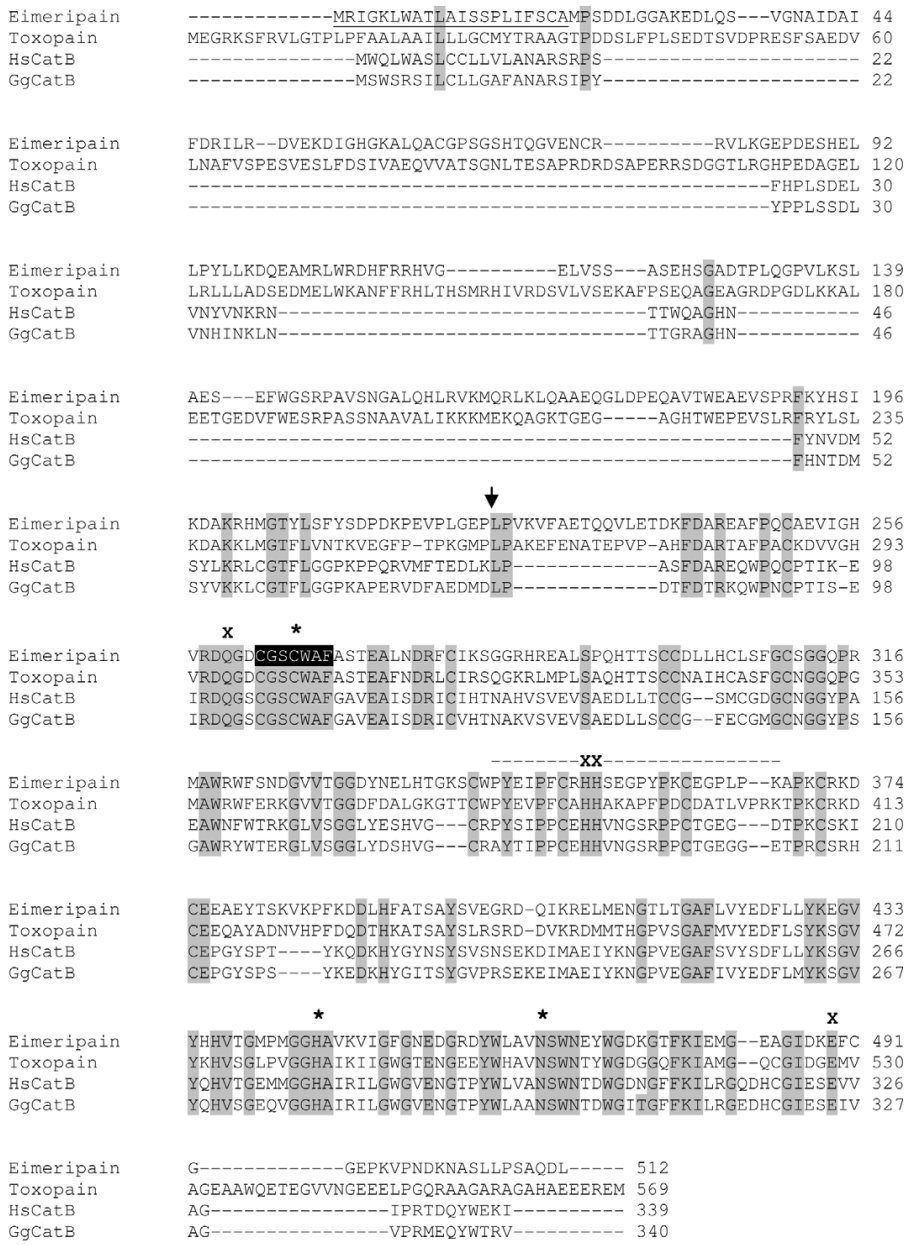


Figure 4. Sequence alignment of the pro-protein of the *E. tenella* cathepsin B. An alignment of amino acid sequences of the *E. tenella* cathepsin B with cathepsin B expressed by *T. gondii* (toxopain-1, Accession n° AAL60053), *Homo sapiens* (HscatB, AAC37547.1) and *Gallus gallus* (GgCatB, AAA87075.1) is shown. The predicted signal peptide, according to SignalP (www.expasy.org) for the *E. tenella* cathepsin B is underlined. Identical residues are shaded in gray. The arrow indicates the probable cleavage site separating the pro- from the catalytic domain. Asterisks indicate the conserved essential catalytic triad residues. The predicted conserved occluding loop is shown with a dashed line. The conserved peptide sequence containing the catalytic Cys266 is highlighted in black. The characteristic aminoacids of cathepsin B like proteases are indicated by a cross and correspond to Gln260 of the oxyanion hole, the two His352-His353 of the occluding loop, and Glu489, at the base of the S2 pocket.
doi:10.1371/journal.pone.0031914.g004

Role of eimeripain in cell invasion by sporozoites

We showed that eimeripain was revealed as a 33 kDa band by the probe Biot-LC-LVG-CHN$_2$ both in the unsporulated and sporulated oocysts (Figure 3). This size was expected for the active form of the protease, suggesting a role during sporulation but also, potentially, in the first steps of the infectious process (Figure 3). Therefore, we addressed the potential role of eimeripain in cell invasion by sporozoites. The invasion assay was performed with *E.*

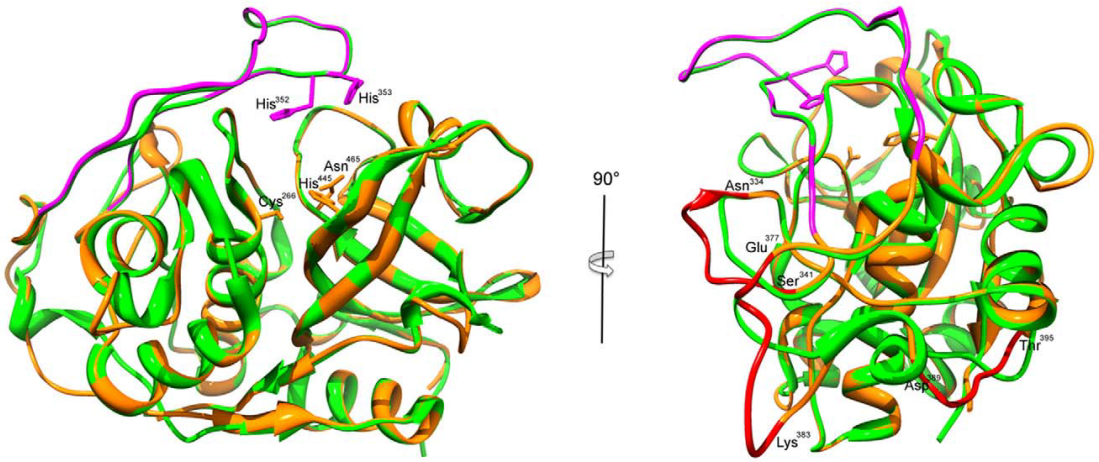


Figure 5. Ribbon diagram superposition of the catalytic domains of the *E. tenella* cathepsin B and human cathepsin B. The X-ray crystallographic structure of the human cathepsin B (pdb 1 gmy) is colored in green and the proposed structure of homology-based model of the *E. tenella* cathepsin B is in orange. The catalytic triad residues (Cys266, His445 and Asn465) are depicted in the *ball-and-stick* representation. On the left panel, the occluding loop is represented in purple with the two adjacent histidine residues (His352, His353) in the *ball-and-stick* representation. On the right panel, the surface exposed loops specific to *E. tenella* cathepsin B are in red. The residues delimitating the loops: Asn334-Ser341, Glu377-Lys383 and Asp389-Thr395 are shown.
doi:10.1371/journal.pone.0031914.g005

tenella sporozoites pre-treated or not with CA-074 Me, a cell permeable inhibitor of cathepsin B (Figure 7). Addition of the inhibitor significantly ($P<0.05$) impaired the capacity of the sporozoites to invade MDBK cells with a 63% inhibition of invasion in the presence of 100 µM of CA-074 Me. This phenotype was not due to a lethal effect of CA-074 Me since in an acridine orange/ethidium bromide viability assay, inhibitor-incubated-sporozoites had statistically similar viability to that seen in inhibitor-free samples. Thus, the mean viability ($n = 2$) of sporozoites incubated for 1 hr at 41°C with 0, 10, 20, 50 or 100 µM of CA-074 Me was 94%, 84%, 88%, 90% and 84%, respectively; one-way analysis of variance showed that there were no significant differences in the mean values of these different treatment groups with a P value of 0.7355, an F value of 0.506 and an R-squared of 0.2881. Consequently, these data indicated that eimeripain plays an important role in cell invasion by sporozoites of *E. tenella*.

Discussion

CPs are major virulence factors for protozoan parasites. They are implicated in key steps of infectious processes making them attractive therapeutic targets (for review see [28]). In this study, we characterized CPs expressed by *E. tenella*, one of the most virulent species of *Eimeria* in chickens. By blasting the *E. tenella* genome (http://www.genedb.org/Homepage/Etenella), we found five genes encoding for putative cysteine proteases: one homolog to cathepsin B (eimeripain); one to cathepsin L (EtCPL); and three to cathepsin C (EtCPC1, EtCPC2 and EtCPC3). The gene predictions did not allow us to identify the start and stop codons for all genes; however, we were able to determine their expression profiles by using specific primers for conserved regions and were able to show that all these predicted genes are transcribed. Although five cysteine protease genes were identified in the genome of *E. tenella*, the probe Biot-LC-LVG-CHN_2 detected up to eight polypeptides in the unsporulated oocyst. The probe might have detected other cysteine proteases whose genes are specific to the *Eimeria* genus or multiple forms of the same protease.

Only one mRNA of the five genes coding for cathepsins that encoding EtCPC1 is expressed exclusively in the fully sporulated oocysts. However, EtCPC1 is not labelled by Biot-LC-LVG-CHN_2 at this stage. While it is possible that the probe did not label the active form of EtCPC1, an alternative explanation is that EtCPC1 may remain in its zymogen form before maturation and activation in further steps of the parasite life cycle. Consistent with this latter hypothesis, TgCPC1, the homolog of EtCPC1 in *T. gondii*, is associated with the parasitophorous vacuole and is involved in intracellular survival of the parasite [9]. Accordingly, EtCPC1 may similarly remain inactive in oocysts, and then be activated during intracellular parasite development, which starts several hours post invasion of epithelial cells by sporozoites [29], [30].

Three of the five genes coding for cathepsins the cathepsin L and two of the cathepsin Cs (EtCPC2 and EtCPC3) are expressed in unsporulated oocysts and at the earliest time point of sporulation analyzed in this study (6 h) but not at later time points or in fully sporulated oocysts. This suggests a role(s) in the initiation of sporulation, a component of the parasite's sexual cycle where meiotic division of the diploid zygote, within the unsporulated oocysts, leads to the production of four haploid sporoblasts. However, this idea awaits demonstration since all of the detected protease activity against Z-FR-AMC and Z-LR-AMC in oocyst lysates can be inhibited by the cathepsin B-specific inhibitor, CA-074. Z-FR-AMC and Z-LR-AMC are specific substrates for CPs with endopeptidase activities (i.e., cathepsin B and cathepsin L), so cathepsin Cs, which exhibit dipeptidyl aminopeptidase activities, are not expected to cleave these substrates. However, the same argument cannot account for the absence of cathepsin L-specific activity on Z-FR-AMC or Z-LR-AMC; this may reveal a specific biochemical property of EtCPL or indicate that it is maintained in an inactive pro-form in unsporulated oocysts.

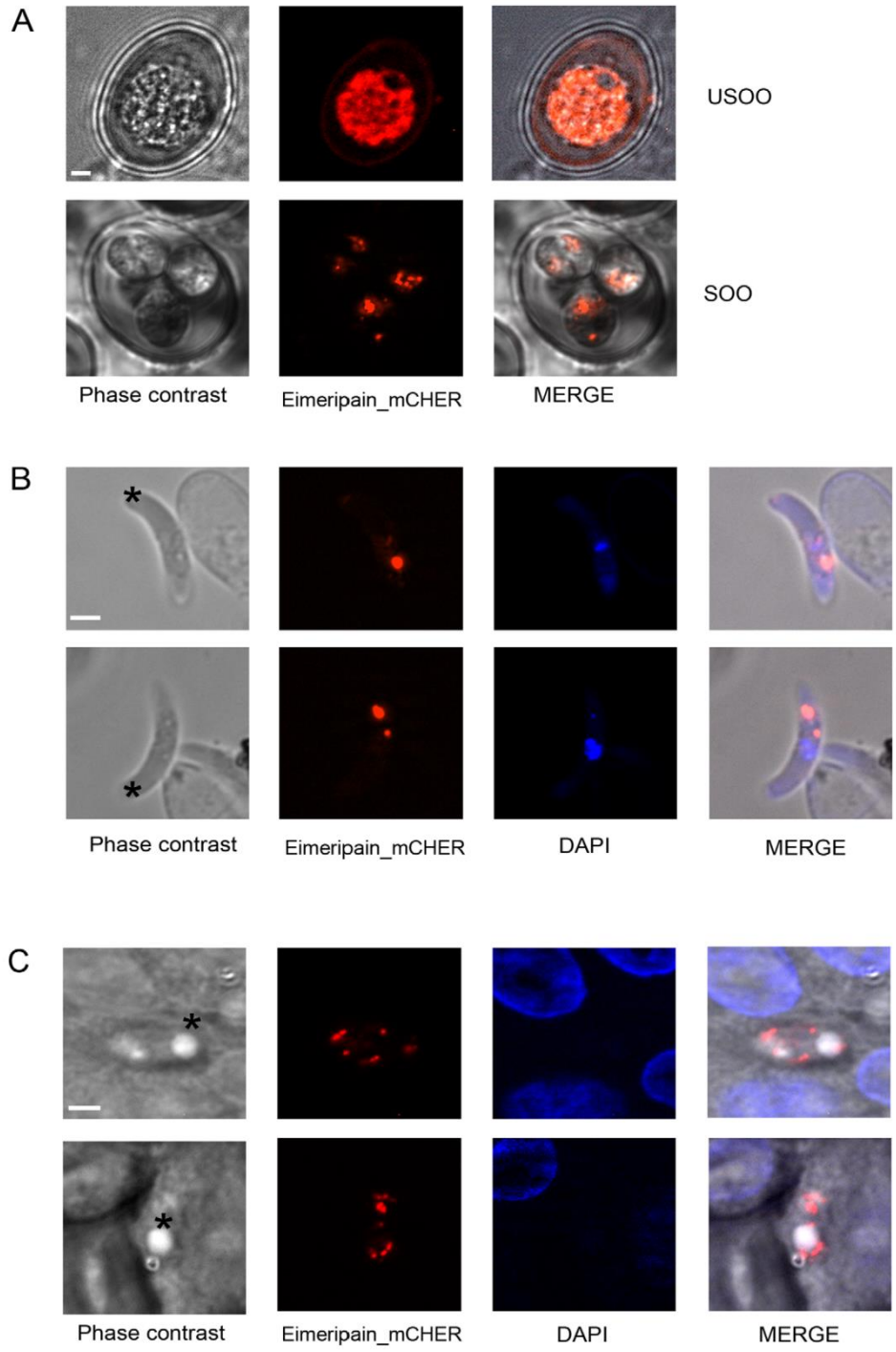


Figure 6. Localization of eimeripain_mCHER within *E. tenella*. Sporozoites were transfected with the plasmid pEimerip/Eimerip_mCherry and directly inoculated into chickens via the cloaca to complete the *Eimeria* life cycle *in vivo*. Seven days post-inoculation, oocysts were harvested from the caeca. mCherry+parasites (red) were observed with a Zeiss Axiovert 200 microscope equipped with the Apotome imaging system. (A) Localization of eimeripain_mCHER in unsporulated oocysts (USOO) and sporulated oocysts (SOO). (B) Localization of eimeripain_mCHER in extracellular sporozoites. Nuclei of sporozoites were stained with DAPI (blue). Two examples of eimeripain_mCHER expressing sporozoites are shown. (C) Localization of eimeripain_mCHER in intracellular sporozoites. Infected MDBK cells were fixed and observed 24 h post invasion by recombinant

sporozoites. Nuclei of host cells are detected with DAPI (blue). Two examples of intracellular eimeripain_mCHER expressing sporozoites are shown. The posterior refractile body is indicated by an asterisk. The scale bar represents 2 μm.
doi:10.1371/journal.pone.0031914.g006

We identified a single gene coding for a cathepsin a cathepsin B that is expressed throughout sporulation. Activity associated with this enzyme corresponds to a 33 kDa protein band detected in all oocyst stages by the probe Biot-LC-LVG-CHN$_2$. The *E. tenella* cathepsin B shares 43.1% sequence identity with the catalytic domain of human cathepsin B and 53% identity with toxopain-1, the cathepsin B from the related apicomplexan parasite, *T. gondii* [3]. The *E. tenella* cathepsin B has the active triad sequence of cysteine, asparagine and histidine and, like toxopain-1, contains a characteristic occluding loop sequence and has a relatively long pro-domain. Homology modelling reveals that the overall structure of the catalytic domain is very similar to that of human cathepsin B, which in turn is very similar to that predicted for toxopain-1 [3]. We have, therefore, named the *E. tenella* cathepsin B, eimeripain.

Studies performed on trafficking of human cathepsin B have shown that a C-terminus GFP fusion of the protease is correctly trafficked and targeted to lysosomal compartments in thyroid epithelial cells [31]. We therefore decided to study the localization of eimeripain by transfecting sporozoites with a version of the protease that has its C-terminus fused to the red fluorescent protein, mCherry [26], [27]. To our knowledge, our work represents the first use of transfection to study the localization of a protein expressed by *E. tenella*. Unsporulated oocysts express the fusion protein, eimeripain_mCHER, uniformly in the zygote. In contrast, eimeripain_mCHER has a punctated distribution in sporozoites. This localization is similar to that described for cathepsin L in *T. gondii* (TgCPL). TgCPL is associated with endocytic organelles, most particularly a newly reported vacuolar compartment at the apical region of tachyzoites that undergoes dynamic fragmentation during *T. gondii* replication [32], [33]. It is not yet known whether such vacuolar, lysosomal-like compartments are also present in sporozoites of *Eimeria*.

TgCPL has been shown to be important for proteolytic maturation of pro-proteins targeted to the micronemes [32] and its inhibition severely impairs cell invasion [5]. Indeed, invasion of target cells by apicomplexan parasites is a conserved mechanism involving the sequential secretion of apical organelles involved in cell attachment (micronemes) and penetration (rhoptries) [34], [35]. Eimeripain, in contrast to toxopain-1, which is found in the rhoptries [3], does not appear to localize in these compartments (Figure 6). However, the inhibition of this protease by CA-074 Me inhibits cell invasion by *E. tenella* (Figure 7). The effect of CA-074 Me on cell invasion by sporozoites of *E. tenella* may be indirect; CA-074 Me could inactivate eimeripain and impair the proteolytic processing of substrates necessary for proper cell invasion to occur, as observed with TgCPL [32]. Eimeripain, similarly to TgCPL, may be responsible for the maturation of one or several substrates belonging to these compartments. However, it should also be noted that, since the active form of this cathepsin B is also expressed in unsporulated oocysts, the protease may also have a specific function in sporulation that remains to be determined.

In model apicomplexan parasites, CPs have been implicated mainly in key facets of asexual cell biology. This is reinforced in our study where we show that eimeripain plays a role in cell invasion by *E. tenella* sporozoites. On the other hand, another implication of our work is that CPs may play an as yet undescribed role in sporulation. There is currently only circumstantial evidence that proteases are involved in sporulation [13], [14], [15], [16] and our descriptions of the relative timings of expression of different CPs during sporulation adds to this body of evidence. However, unsporulated oocysts undergo major morphological changes during sporulation and such remodelling typically involves proteases. With the advent of gene transfection strategies, as described by us and others [26], [27], *Eimeria* becomes a particularly suitable model to study the molecular mechanisms involved in sporulation. The large number of oocysts shed are easily purified, allowing performance of proteomic and molecular studies that are essential to understand the mechanisms involved in oocyst development; similar studies in other apicomplexans are substantially more difficult. The determination of the role of *E. tenella* CPs expressed at these stages may help the discovery of new targets aimed at preventing dissemination of the parasite.

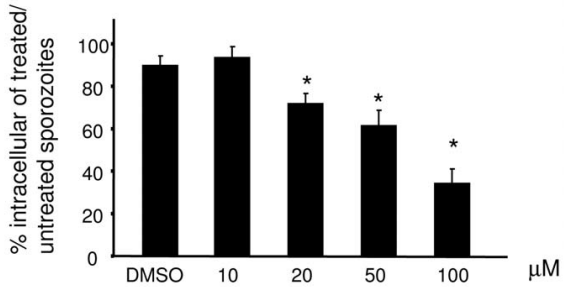


Figure 7. Effect of CA-074 Me on MDBK cell invasion by *E. tenella* sporozoites. Purified sporozoites were incubated with 10 to 100 μM of CA-074ME, a specific cathepsin B inhibitor permeable to membranes or with 1% DMSO. Sporozoites were then washed and incubated with MDBK cells. Infected cells were fixed and intracellular parasites were detected by IF using specific sera against sporozoites, and counted. The data represent three independent experiments. * denotes significant differences at $p<0.05$ in the capacity of CA-074 Me- treated parasites to invade cells compared to the control.
doi:10.1371/journal.pone.0031914.g007

Materials and Methods

Parasites and cells

Groups of outbred PA12 chickens of 4 to 6 weeks old of age were inoculated orally with 10^4 sporulated oocysts of *E. tenella* Wis strain [36]. Seven days post-inoculation, unsporulated oocysts were harvested from infected caeca, purified and kept at 4°C with 1 mM sodium dithionite (Sigma Aldrich) to prevent sporulation until needed [37]. Care and euthanasia of animals were practised according to national ethic guidelines. For the sporulation time course experiments, sodium dithionite was removed and purified unsporulated oocysts were incubated at various times at 25°C in 2% potassium dichromate and processed immediately for further biochemical analysis [37]. Sporozoites were obtained after breaking sporulated oocyst walls with glass beads and incubated in the excystation medium (biliary salts 0.5%, trypsin 0.25% diluted in PBS pH 7.6) at 41°C for 75 min. Sporozoites were purified by a two step filtration protocol, first on cotton and then on polycarbonate filters (5 μm) (GE Water & Process Technologies).

Madin-Darby bovine kidney (MDBK) cells [38] were propagated in Ham's F12 medium containing 5% foetal calf serum,

2 mM glutamine, 10 UI/ml penicillin, 10 µg/ml streptomycin (Lonza).

Ethics statements

Experimental protocols were designed in compliance with French law (Décret 2001-464 29/05/01) concerning the use of laboratory animals. Care and euthanasia of animals were practised according to national ethic guidelines and approved by the ethics committee of the Région Centre (CL2007-36). The authors are committed to the principals of the 3Rs: Reduction, refinement and replacement of experimental animals.

Identification of CP encoding genes in *E. tenella* genome

E. tenella genome sequences and gene models were downloaded from http://www.genedb.org/Homepage/Etenella The genome of *E. tenella* Houghton was produced by the Parasite Genomics Group at the Wellcome Trust Sanger Institute (http://www.sanger.ac.uk/research/projects/parasitegenomics/) and has been provided prepublication. BLASTP search was performed in GeneDB using as queries CPs described in *T. gondii* including one cathepsin B, toxopain-1 (AAL60053), one cathepsin L, TgCPL (ABD64744), and three cathepsin Cs, TgCPC1 (AAZ15654), TgCPC2 (AAZ15655) and TgCPC3 (AAZ15656); and *P. falciparum* including falcipain-1 (AAN37166), falcipain-2 (AAK06665), falcipain-2′ (AAX77225), falcipain-3 (AAF77192), DPAP1 (AAN35758), DPAP2 (AAN36542) and DPAP3 (XP_001351359). CP genes in *Eimeria* have been named after their closest homologs in *T. gondii*.

RNA extraction and RT-PCR on oocyst lysates using specific CP primers

Pellets of oocysts (5×10^7), taken at different time after the commencement of sporulation, were vortexed with 0.5 mm glass beads until the total destruction of oocyst walls. Total RNAs were obtained by treatment of broken oocysts with TRIzol (1 ml) (Invitrogen) for 5 min at room temperature, extraction with 20% chloroform, and precipitation with 50% isopropanol. RNAs were resuspended in nuclease-free water to a final concentration of 1 mg/ml. Aliquots of 1 µg of total RNAs were used to reverse transcribe total mRNAs using a Poly dT primer and reverse transcriptase II (Invitrogen). Segments of cDNAs were amplified using specific primers to *eimeripain*, 5′-CTGGGGAAGCCGGCCAGCTGTTAGC-3′ and 5′-CGTTCCAGCTGTTCACAGCTAGCCAG-3′, to *etcpl*, 5′-CAACCAACAAGGTCACTCTTAC-3′ and 5′-CCCTCGAGGGCCCCCGTGCTCG-3, to *etcpc1*, 5′-CGCCAAAGGCTACGGCTACGTGG-3′ and 5′-CCGCGAGTGAGGTCGGGGTCAATG-3′, to *etcpc2*, 5′-CCAAATCAGGGCGACTGCGGCTCTTG-3′ and 5′-GCCCCCAACATAATACCATTTGGAAAC-3′, to *etcpc3*, 5′-CGCTCAGGAGTACAACTACGTGGGTGG-3′ and 5′-GCTGCTGCACAAGCAGCGCTGCTCTGCC-3′, to *actin*, 5′-ATCTTCATCGTAGACGGAGCCAG-3′ and 5′-GTGTGTCCCACACTGTTCCTATC-3′. The reaction conditions for RT-PCR were 95°C for 1 min, 58°C for 30 s and 72°C for 1 min for 30 cycles using the Go Taq DNA polymerase (Promega). Amplification products were loaded onto a 0.7% agarose gel stained with ethidium bromide.

Activities of CPs in oocyst lysates

Oocysts (5×10^7) were removed at different time after the commencement of sporulation and lysates were obtained by vortexing pellets with 0.5 mm glass beads until the total destruction of oocyst walls [37]. Pellets were resuspended in buffer A (sodium acetate 100 mM, pH 5.5, in the presence of 1 mM phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF), 0.04 mM pepstatin A, 1 mM methylmethane thiosulfonate (MMTS) and 1 mM EDTA) to obtain a final concentration of proteins in oocyst lysate of 1 mg/ml as determined using the Bradford protein assay (Biorad). Beads were removed and lysates were sonicated twice for 30 s, amplitude 40 (Bioblock scientific, Vibracell 75455), centrifuged for 10 min at 13000 rpm at 4°C and the supernatant kept at −80°C for future biochemical experiments to detect CP activities using either fluorescent dipeptides or the probe, Biot-LC-LVG-CHN_2 [20]. To detect endopeptidase CP activities using fluorescent dipeptides, lysates were preincubated or not with 28 µM E-64 or 100 µM L-3-*trans*-(propylcarbamyl)oxirane-2-carbonyl)-L-isoleucyl-L-proline (CA-074) for 10 min at 30°C in buffer A and 2 mM DTT before addition of either 10 µM Z-FR-AMC (benzyloxycarbonyl-Phe-Arg-(7-Amido-4-methylcoumarin)), 10 µM Z-LR-AMC ((benzyloxycarbonyl-Phe-Arg-(7-Amido-4-methylcoumarin)) or 10 µM Z-RR-AMC ((benzyloxycarbonyl-Arg-Arg-(7-Amido-4-methylcoumarin)) (Bachem). Activities were monitored on a spectrofluorimeter (Photon Technology International) with $\lambda_{excitation} = 350$ nm, $\lambda_{emission} = 450$ nm. Independently, lysates were preincubated or not for 1 h at 25°C with 100 µM CA-074 before addition of 20 µM of the cystatin-derived activity-based probe Biot-LC-LVG-CHN_2 for 1 h at 25°C in buffer A with 2 mM DTT. Samples were loaded on a 10% SDS-polyacrylamide gel, transferred onto a nitrocellulose membrane (GE healthcare) and tagged active CPs were revealed by Western blot using streptavidin coupled to peroxidase (1/3000). Detection was performed using the Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific).

Cloning of eimeripain cDNA and construction of pEimerip/Eimerip_mCherry localization vector

By blasting the *E. tenella* genome against toxopain-1 (cathepsin B in *T. gondii*), we obtained a hit with gene ID ETH_00003570 (E value = 1.1e-122). Primers were designed upstream from the predicted start site (fETCPB3: 5′-GCCAACCACAGCGCAGCTCCGAGGTG-3′) and downstream from the predicted STOP codon (rETCPB3: 5′-GCCGCGGTTAGCCGCAACTTCGACC-3′) to amplify the cathepsin B gene (*eimeripain*) from *E. tenella* sporozoite cDNAs. The amplification product was sequenced, which confirmed the sequence prediction of ETH_00003570. To localize eimeripain within the parasite, we constructed a vector allowing the expression of an eimeripain_mCHER fusion under the control of the *eimeripain* promoter. Since *eimeripain* does not contain any intron, we used genomic DNA to amplify a 3 kb region with primers fPrEtCPBMlu and rEtCPBSal. The amplification product, MluI-PrEtCPB/EtCPB-SalI, started 1 kb upstream from the start codon of *eimeripain* (this region is hypothesized to contain the endogenous promoter of *eimeripain*, as commonly observed in *T. gondii*) until the last amino acid codon of *eimeripain*. MluI-PrEtCPB/EtCPB-SalI was cleaved by MluI and SalI and cloned into the mCherry core construct-1 kindly provided by Dr Damer Blake [26]. The mCherry core construct-1 contains the promoter of the microneme protein-1 (Mic-1), which drives the expression of the fluorescent protein mCherry (λExcitation = 587 nm; λEmission = 610 nm). mCherry core construct-1 was cleaved by MluI and SalI to remove the *mic-1* promoter, which was replaced by the 3 kb MluI-PrEtCPB/EtCPB-SalI insert, leading to the vector pEimerip/Eimerip_mCherry in which eimeripain is C-terminally fused in frame with mCherry. The fusion protein eimeripain-mCHER is expressed under the control of the endogenous *eimeripain* promoter.

Alignment analysis and molecular modelling of eimeripain. The protein sequences for pro-eimeripain

(Accession n° JN641867), pro-toxopain-1 (AAL60053), pro-human cathepsin B (AAC37547.1) and pro-chicken cathepsin B (AAA87075.1) were aligned by using CLUSTALW2 (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/). An automated comparative protein modelling program, SWISS-MODEL, was used to predict the 3D structure of the eimeripain catalytic domain [39]. Human cathepsin B served as a template protein (pdb accession nb: 1 gmy). The reliability of the generated model was evaluated by QMEAN4 scoring function. Molecular illustrations were prepared using UCSF Chimera (UCSF Chimera-a visualization system for exploratory research and analysis [40].

Localization of eimeripain within parasites

Freshly excysted sporozoites were resuspended in complete cytomix buffer (10 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4, pH 7.6, 120 mM KCl, 0.15 mM $CaCl_2$, 25 mM HEPES, 2 mM EGTA, 5 mM $MgCl_2$, 2 mM ATP and 5 mM glutathione) as described previously [26]. pEimerip/Eimerip_mCherry vector was linearized with ScaI (2 U) and 20 µg added to 100 µl of cytomix resuspended sporozoites (2×10^6 parasites) for REMI transfection [26]. Electroporation occurred in a gene pulser electroporator (Biorad) using 1000 V, 25 µF in a 2 mm electroporation cuvette. To obtain stable transfectants, electroporated sporozoites were resuspended in Ham's F12 medium with 3% FBS (2 ml) and immediately inoculated into five PA12 chickens (2×10^5 transfected sporozoites per animal) via the cloacal route as described previously [26]. Seven days post-inoculation, recombinant oocysts were harvested from the caeca and kept at 4°C or incubated at 25°C for 48 h to obtain sporulated oocysts.

Purified recombinant sporozoites were fixed in 2.7% paraformaldehyde (PFA) and air dried on a glass slide or incubated with MDBK cells for 24 h. Extracellular parasites and infected cells were fixed in 2.7% PFA for subsequent immunofluorescence analysis. Cell and parasite nuclei were fixed and stained with 1.5 µg/ml of DAPI (Vectashield). Fluorescence imaging was done using a Zeiss Axiovert 200 microscope equipped with the Apotome imaging system. Images were generated and analyzed by using the Axiovision Software (Carl Zeiss SA).

E. tenella viability assay

Viability of extracellular *E. tenella* sporozoites pre-incubated with CA-074 methyl ester (CA-074 Me), a specific cell-permeable inhibitor of cathepsin B, was assessed using acridine orange and ethidium bromide, as described previously [41], [42]. Acridine orange is able to penetrate all parasites and stains nucleic acids green, whereas ethidium bromide, which binds to nucleic acids and fluoresces orange, is only able to enter parasites once the integrity of the cell membrane is compromised. Sporozoites (4×10^5) were incubated with various concentration of CA-074 Me for 1 h at 41°C. Parasites were washed twice in PBS and acridine orange and ethidium bromide were added at 0.1 µg/ml. Extracellular parasites were visualized and counted using an Olympus BX41 microscope. The percentage of non viable parasites was determined as the ratio of red dead parasites *versus* the entire green population ×100.

Invasion assay

Freshly excysted purified sporozoites (2×10^5) were incubated with non lethal concentrations of CA-074 Me for 1 h at 41°C in 500 µl of Ham's F12. Sporozoites were washed twice in PBS and incubated with MDBK cells in 24 well plates with coverslips at the bottom, (multiplicity of infection of one), for 1 h at 41°C, 5% CO_2. Infected cells were washed and fixed in 2.7% PFA. Monolayers were then permeabilized with 0.1% Triton X-100, and intracellular parasites were labelled with a mouse anti-sporozoite antibody (1/2000) followed by incubation with a secondary anti-mouse antibody coupled to Alexa 594 (1/1000) (red fluorescence). Monolayers were mounted in Vectashield containing 1.5 µg/ml of DAPI (Clinisciences, France) to label nuclei. Infected cells were examined using a Zeiss Axiovert 200 microscope. The percentage of intracellular parasites was determined as the number of intracellular parasites (red) for 100 MDBK cells (blue nuclei). More than 200 cells were counted for each condition in three independent experiments with two wells per condition, and the values reported are means ± standard errors.

Statistics

Statistical comparisons, in the viability test or the invasion assay, were performed using first a generalized linear model and then a Newman-Keuls test. Statistics were conducted assuming equal variance, unpaired samples, and using a 2-tailed distribution. For statistical analysis of sporozoite viability prior to the invasion assay, we used a one-way analysis of variance.

Differences were considered to be statistically significant at a P value<0.05.

Acknowledgments

The authors are grateful to Janene Bumstead, Damer Blake and Fiona Tomley (Royal Veterinary College, London) for kindly providing us with the Wis strain of *E. tenella*, the MDBK cells and the mCherry core construct-1 plasmid. We also would like to thank Marie de l'Espinay for her help in the construction of the eimeripain localization vector. We thank Anne Silvestre and Françoise I. Bussière for critical reading of the manuscript and Jacques Cabaret and Philippa Sharman for help with the statistical analysis.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: GL FB. Performed the experiments: AR SG FL AN. Analyzed the data: FL MK NCS GL FB. Wrote the paper: FB.

References

1. Ling KH, Rajandream MA, Rivailler P, Ivens A, Yap SJ, et al. (2007) Sequencing and analysis of chromosome 1 of Eimeria tenella reveals a unique segmental organization. Genome Res 17: 311 319.
2. Rawlings ND, Morton FR, Kok CY, Kong J, Barrett AJ (2008) MEROPS: the peptidase database. Nucleic Acids Res 36: D320 325.
3. Que X, Ngo H, Lawton J, Gray M, Liu Q, et al. (2002) The cathepsin B of Toxoplasma gondii, toxopain-1, is critical for parasite invasion and rhoptry protein processing. J Biol Chem 277: 25791 25797.
4. Teo CF, Zhou XW, Bogyo M, Carruthers VB (2007) Cysteine protease inhibitors block Toxoplasma gondii microneme secretion and cell invasion. Antimicrob Agents Chemother 51: 679 688.
5. Larson ET, Parussini F, Huynh MH, Giebel JD, Kelley AM, et al. (2009) Toxoplasma gondii cathepsin L is the primary target of the invasion-inhibitory compound morpholinurea-leucyl-homophenyl-vinyl sulfone phenyl. J Biol Chem 284: 26839 26850.
6. Klemba M, Gluzman I, Goldberg DE (2004) A Plasmodium falciparum dipeptidyl aminopeptidase I participates in vacuolar hemoglobin degradation. J Biol Chem 279: 43000 43007.
7. Drew ME, Banerjee R, Uffman EW, Gilbertson S, Rosenthal PJ, et al. (2008) Plasmodium food vacuole plasmepsins are activated by falcipains. J Biol Chem 283: 12870 12876.
8. Sijwali PS, Rosenthal PJ (2004) Gene disruption confirms a critical role for the cysteine protease falcipain-2 in hemoglobin hydrolysis by Plasmodium falciparum. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 4384 4389.
9. Que X, Engel JC, Ferguson D, Wunderlich A, Tomavo S, et al. (2007) Cathepsin Cs are key for the intracellular survival of the protozoan parasite, Toxoplasma gondii. J Biol Chem 282: 4994 5003.
10. Arastu-Kapur S, Ponder EL, Fonovic UP, Yeoh S, Yuan F, et al. (2008) Identification of proteases that regulate erythrocyte rupture by the malaria parasite Plasmodium falciparum. Nat Chem Biol 4: 203 213.

11. Eksi S, Czesny B, van Gemert GJ, Sauerwein RW, Eling W, et al. (2007) Inhibition of Plasmodium falciparum oocyst production by membrane-permeant cysteine protease inhibitor E64d. Antimicrob Agents Chemother 51: 1064 1070.
12. Eksi S, Czesny B, Greenbaum DC, Bogyo M, Williamson KC (2004) Targeted disruption of Plasmodium falciparum cysteine protease, falcipain 1, reduces oocyst production, not erythrocytic stage growth. Mol Microbiol 53: 243 250.
13. Lal K, Bromley E, Oakes R, Prieto JH, Sanderson SJ, et al. (2009) Proteomic comparison of four Eimeria tenella life-cycle stages: unsporulated oocyst, sporulated oocyst, sporozoite and second-generation merozoite. Proteomics 9: 4566 4576.
14. Miska KB, Fetterer RH, Barfield RC (2004) Analysis of transcripts expressed by Eimeria tenella oocysts using subtractive hybridization methods. J Parasitol 90: 1245 1252.
15. Fetterer RH, Miska KB, Barfield RC (2005) Partial purification and characterization of an aminopeptidase from Eimeria tenella. J Parasitol 91: 1280 1286.
16. Fetterer RH, Miska KB, Lillehoj H, Barfield RC (2007) Serine protease activity in developmental stages of Eimeria tenella. J Parasitol 93: 333 340.
17. Kinnaird JH, Bumstead JM, Mann DJ, Ryan R, Shirley MW, et al. (2004) EtCRK2, a cyclin-dependent kinase gene expressed during the sexual and asexual phases of the Eimeria tenella life cycle. Int J Parasitol 34: 683 692.
18. Barrett AJ (1980) Fluorimetric assays for cathepsin B and cathepsin H with methylcoumarylamide substrates. Biochem J 187: 909 912.
19. Rosenthal PJ (2011) Falcipains and other cysteine proteases of malaria parasites. Adv Exp Med Biol 712: 30 48.
20. Lalmanach G, Mayer R, Serveau C, Scharfstein J, Gauthier F (1996) Biotin-labelled peptidyl diazomethane inhibitors derived from the substrate-like sequence of cystatin: targeting of the active site of cruzipain, the major cysteine proteinase of Trypanosoma cruzi. Biochem J 318(Pt 2): 395 399.
21. Florent I, Lecaille F, Montagne JJ, Gauthier F, Schrevel J, et al. (2005) Labelling of four distinct trophozoite falcipains of Plasmodium falciparum by a cystatin-derived probe. Biol Chem 386: 401 406.
22. Illy C, Quraishi O, Wang J, Purisima E, Vernet T, et al. (1997) Role of the occluding loop in cathepsin B activity. J Biol Chem 272: 1197 1202.
23. Naudin C, Lecaille F, Chowdhury S, Krupa JC, Purisima E, et al. The occluding loop of cathepsin B prevents its effective inhibition by human kininogens. J Mol Biol 400: 1022 1035.
24. Turk V, Stoka V, Vasiljeva O, Renko M, Sun T, et al. (2011) Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers. Biochim Biophys Acta 1824: 68 88.
25. Musil D, Zucic D, Turk D, Engh RA, Mayr I, et al. (1991) The refined 2.15 A X-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity. Embo J 10: 2321 2330.
26. Clark JD, Billington K, Bumstead JM, Oakes RD, Soon PE, et al. (2008) A toolbox facilitating stable transfection of Eimeria species. Mol Biochem Parasitol 162: 77 86.
27. Liu X, Shi T, Ren H, Su H, Yan W, et al. (2008) Restriction enzyme-mediated transfection improved transfection efficiency in vitro in Apicomplexan parasite Eimeria tenella. Mol Biochem Parasitol 161: 72 75.
28. Lecaille F, Kaleta J, Bromme D (2002) Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. Chem Rev 102: 4459 4488.
29. Lawn AM, Rose ME (1982) Mucosal transport of Eimeria tenella in the cecum of the chicken. J Parasitol 68: 1117 1123.
30. Tierney J, Mulcahy G (2003) Comparative development of Eimeria tenella (Apicomplexa) in host cells in vitro. Parasitol Res 90: 301 304.
31. Linke M, Herzog V, Brix K (2002) Trafficking of lysosomal cathepsin B-green fluorescent protein to the surface of thyroid epithelial cells involves the endosomal/lysosomal compartment. J Cell Sci 115: 4877 4889.
32. Parussini F, Coppens I, Shah PP, Diamond SL, Carruthers VB (2010) Cathepsin L occupies a vacuolar compartment and is a protein maturase within the endo/exocytic system of Toxoplasma gondii. Mol Microbiol 76: 1340 1357.
33. Miranda K, Pace DA, Cintron R, Rodrigues JC, Fang J, et al. (2010) Characterization of a novel organelle in Toxoplasma gondii with similar composition and function to the plant vacuole. Mol Microbiol 76: 1358 1375.
34. Carruthers VB, Sibley LD (1997) Sequential protein secretion from three distinct organelles of Toxoplasma gondii accompanies invasion of human fibroblasts. Eur J Cell Biol 73: 114 123.
35. Dubremetz JF, Garcia-Reguet N, Conseil V, Fourmaux MN (1998) Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. Int J Parasitol 28: 1007 1013.
36. Jeffers TK (1975) Attenuation of Eimeria tenella through selection for precociousness. J Parasitol 61: 1083 1090.
37. Shirley MW (1995) Eimeria species and strains of chicken. Biotechnology-Guidelines on Techniques in Coccidiosis Research Luxembourg: The European Commission DGXII. pp 1 24.
38. Bumstead JM, Topham SJ, Tomley FM (1998) Inhibition of the development of Eimeria tenella in cultured bovine kidney cells by a soluble factor produced by peripheral blood lymphocytes from immune chickens. Parasitology 117(Pt 1): 39 47.
39. Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch MC (2003) SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. Nucleic Acids Res 31: 3381 3385.
40. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, et al. (2004) UCSF Chimera a visualization system for exploratory research and analysis. J Comput Chem 25: 1605 1612.
41. Borel E, Mayencon M, Kaiser K, Picot S, Peyron F (1998) Fluorogenic detection of viable Toxoplasma gondii. Parasite 5: 371 373.
42. Lees MP, Fuller SJ, McLeod R, Boulter NR, Miller CM, et al. (2010) P2X7 receptor-mediated killing of an intracellular parasite, Toxoplasma gondii, by human and murine macrophages. J Immunol 184: 7040 7046.

Annexe 5 : L’aminopeptidase N1 (*Et*-ApN1), une M1 métallo-protéase du parasite apicomplexe *Eimeria tenella*, participe au développement parasitaire

Aminopeptidase N1 (*Et*-ApN1), a M1 metalloprotease of the apicomplexan parasite *Eimeria tenella* participates in parasite development

Simon Gras[1,2], Anna Byzia[3], Florence B. Gilbert[1,2], Sheena McGowan[4], Marcin Drag[3], Anne Silvestre[1,2], Alisson Niepceron[1,2], Fabien Lecaille[5], Gilles Lalmanach[5], Fabien Brossier[1,2]

[1] INRA, UMR1282, Infectiologie et Santé Publique, F-37380 Nouzilly, France.
[2] Université François Rabelais de Tours, UMR1282, Infectiologie et Santé Publique, F-37000, France

[3] Division of Bioorganic Chemistry, Faculty of Chemistry, Wroclaw University of Technology, Wroclaw, Poland

[4] Department of Biochemistry and Molecular Biology, Monash University, Clayton, Victoria, Australia

[5] Université François Rabelais de Tours, INSERM, UMR 1100, Equipe «Mécanismes protéolytiques dans l'inflammation» - Centre d'Etude des Pathologies Respiratoires (CEPR), F-37000 Tours, France.

*Running title: M1 metalloprotease participates in *E. tenella* development

To whom correspondence should be adressed: INRA, UMR1282, Equipe Pathogenèse des Coccidioses- 37380 Nouzilly, France. E-mail: fbrossier@tours.inra.fr

Keywords: Metalloprotease, Aminopeptidase, Protease inhibitor, Molecular Modeling, Protozoan, Apicomplexa, *Eimeria tenella*.

Background: The *Eimeria tenella* genome is predicted to have at least 45 proteases. Currently, only a minority have been functionally characterized.
Results: *Et*-ApN1, a metalloprotease of the M1 family, may be critical for parasite growth.
Conclusion: *Et*-ApN1 plays a key role in the intracellular development of *E. tenella.*
Significance: *Et*-ApN1 represents a new potential therapeutic target for coccidiosis control.

ABSTRACT

Aminopeptidase N are metalloproteases of the M1 family. *Pf*A-M1, the aminopeptidase N of *Plasmodium falciparum* plays a crucial role in parasite metabolism and development. Inhibition of *Pf*A-M1 with a bestatin derivative illustrated the potency of the enzyme as therapeutic target. Interestingly, aminopeptidase N homologues have also been reported in other apicomplexan parasites, including *Toxoplasma, Cryptosporidium* and *Eimeria*. While investigating the potency of aminopeptidases as a therapeutic target against coccidiosis, one of the most important avian diseases caused by the genus *Eimeria*, we identified and characterized *Et*-ApN1, an eimerial homologue of *Pf*A-M1. *Et*-ApN1 is an active aminopeptidase N present throughout the sporulation process. The *Et*-ApN1 inhibition and reactivation profile are typical of the zinc-metalloproteases. Substrate fingerprinting

revealed that *Et*-ApN1 and *Pf*A-M1 share similar substrate specificity and kinetic parameters. Through western blot analysis, we observed that *Et*-ApN1 is synthesized as a 120 kDa precursor and processed into 96, 68 and 38 kDa forms during sporulation. Immuno-localization assays revealed that *Et*-ApN1 is present during the intracellular life-cycle stage in both the parasite cytoplasm and nucleus. Together, these results indicate that *Et*-ApN1 and *Pf*A-M1 possess sequence and 3D structure similarities but also similar kinetic parameters, maturation pattern and sub-cellular localization, supporting the hypothesis of a conserved role between the two aminopeptidases. They also suggest that in analogy with *Pf*A-M1, which has been described as a therapeutic target against malaria, *Et*-ApN1 could be a potential therapeutic target against avian coccidiosis.

Coccidiosis is the most important avian disease responsible for major economic losses in the poultry industry (Williams 1999; Sharman, Smith *et al.* 2010). It is caused by intestinal infection of chickens with parasites of the *Eimeria* spp. The life cycle of *Eimeria* is divided into an intestinal stage and an environmental stage. The intestinal stage involves the invasion of epithelial cells of chicken intestine by sporozoites, differentiation into schizonts and replication of merozoites within epithelial cells, followed by production of male and female gametes, fertilization and formation of unsporulated oocysts. The environmental stage involves the release of unsporulated oocysts and their maturation, or sporulation, into infectious sporulated oocysts (Norton and Chard 1983). These infectious diseases are currently controlled by the preventative addition of anticoccidial drugs to poultry feed or by administration of live vaccines (Tewari and Maharana 2011). However, the increase of drug-resistant parasite populations and the cost of live vaccines underline the need to find alternative targets and drugs.

The *Eimeria* genus belongs to the apicomplexa phylum, a group of medically and economically important parasites including *Plasmodium spp*. and *Toxoplasma gondii* that cause the human diseases malaria and toxoplasmosis, respectively. Within the seven species of *Eimeria* that infect poultry, *Eimeria tenella* is one of the most virulent (Kipper, Andretta *et al.* 2013) and the only one for which the genome has been sequenced and partially annotated (http://www.genedb.org/Homepage/Etenella) . Two cellular models are usually used for *in vitro* studies of intracellular parasite development: the MDBK cell line and PCKC cells (Hofmann and Raether 1990; Tierney and Mulcahy 2003). It has been hypothesized that proteases play crucial functions in the life cycle of *E. tenella* as observed for other apicomplexa. Previous studies have supported this hypothesis (Rieux, Gras *et al.* 2012). Among parasitic proteases, metalloproteases have been related to pathogenesis and are involved in processes such as immunity evasion, development and metabolism (Harbut, Velmourougane *et al.* 2011; Moon, Kang *et al.* 2011; Matheoud, Moradin *et al.* 2013). Analysis of the *E. tenella* genome revealed the presence of at least 45 proteases genes, 31 % of which were metalloproteases, that are transcribed in different stages of the parasite life cycle (Katrib, Ikin *et al.* 2012).

The presence of an active metalloprotease of the M1 family (Aminopeptidase M1, Alanyl-aminopeptidase, Aminopeptidase N) has been reported in *E. tenella* oocyst lysates throughout sporulation (Fetterer, Miska *et al.* 2005). Recent analysis of the genome identified two putative aminopeptidase N-like proteases that belong to the M1 metalloprotease family (*Et*-ApN1 and *Et*-ApN2) (Katrib, Ikin *et al.* 2012). To date, no data are available on *E. tenella* aminopeptidase N properties or function. In contrast, the plasmodial aminopeptidase N of *Plasmodium falciparum*, *Pf*A-M1, has been well characterized. It is found in various locations such as the parasitophorous

vacuole, food vacuole (Allary, Schrevel *et al.* 2002; Azimzadeh, Sow *et al.* 2010), the cytoplasm (Allary, Schrevel *et al.* 2002; McGowan, Porter *et al.* 2009) and nucleus (Ragheb, Dalal *et al.* 2011). Bestatin-based studies revealed that *Pf*A-M1 is involved in parasite metabolism and development (Azimzadeh, Sow *et al.* 2010; Harbut, Velmourougane *et al.* 2011; Ragheb, Dalal *et al.* 2011).

We examined the presence of active aminopeptidase of *E. tenella* in both development and sporulation phases of the parasite life cycle using bestatin and specific aminopeptidase fluoro-substrates. Herein, we specifically focused on *Et*-ApN1 and investigated its biochemical and molecular properties. We defined its enzymatic characteristics and compared them with those of *Pf*A-M1. In addition, we studied the pattern of expression of *Et*-ApN1 during *E. tenella* sporulation and its subcellular localization during the development of the parasite.

Experimental procedures

Ethics statements - Experimental protocols were designed in compliance with French law (Décret 2001-464 29/05/01) concerning the use of laboratory animals. Care and euthanasia of animals were practiced according to national ethical guidelines and approved by the ethics committee of the Région Centre (CL2007-36). The authors are committed to the principals of the 3Rs: reduction, refinement and replacement of experimental animals.

Parasite harvest - Groups of outbred PA12 chickens, 4-6 weeks of age, were infected orally with 10^4 and 10^5 sporulated oocysts of the *E. tenella* Wis, Wis YFP+ and Wis96 strains, respectively (Jeffers 1975). Unsporulated oocysts were harvested from infected caeca seven or five days post-inoculation for the Wis and Wis96 strain, respectively. Unsporulated oocysts were purified using sodium hypochlorite and M_gSO_4 as described previously (Shirley 1995). For the sporulation time course studies, oocysts were suspended in water containing 2 % potassium dichromate (w/v) and incubated for various times (0, 6, 12, 24, 48 and 72 h) at 26°C. Sporozoites were obtained from fresh fully sporulated oocysts and after breaking the oocyst walls with glass beads, sporocysts were incubated in the excystation medium (trypsin 0.25 % w/v, biliary salts 0.5 % w/v, in PBS 10 mM pH 7.4) at 41°C for 1 h. Sporozoites were purified by a two step filtration protocol, first on cotton and then on polycarbonate filters (5 µm) (Whatman, USA). Second generation merozoites were recovered from chicken caecal mucosa 112 hours after infection with 5×10^5 sporulated oocysts as previously described (Lal, Bromley *et al.* 2009).

Bestatin effect on cell culture - Freshly excysted, purified YFP+ sporozoites (2×10^5) were incubated with 2×10^5 Madin-Darby bovine kidney (MDBK) cells, in 24 well plates in presence of bestatin (50 - 500 µM), for 4 h and 96 h at 41°C, 5 % CO_2 as previously described (Brown, Billington *et al.* 2000). Absence of cytotoxicity induced by bestatin was verified using an MTT assay (Mosmann 1983). For the invasion assay, infected cells were washed 4 h *p.i.* and fixed in 2.7 % PFA. Monolayers were mounted in Vectashield containing 1.5 µg/mL of DAPI (Clinisciences, France) to label nuclei. Infected cells were examined by fluorescent microscopy (Zeiss Axiovert 200 microscope, Carl Zeiss, Germany). At least 200 cells were counted for each condition, in three independent experiments, with two wells per condition. For the development assay, at 96 h *p.i.*, the merozoites present in the supernatant were counted. Values reported are means ± standard errors.

Enzymatic activity assays - Oocyst lysates (10^8) were obtained by stirring oocyst pellets with 0.5 mm glass beads until the total destruction of oocyst walls. Pellets were suspended in 10 mM PBS buffer pH 7.4. Beads were removed and lysates were sonicated twice for 30 s, with 5 s burst, amplitude 40 (Vibracell 75455, Bioblock

scientific, USA). After centrifugation for 30 min 15,000 x g at 4°C, the supernatant was collected, diluted to a final concentration of 1 mg/mL after BCA dosage and stored at -80°C. Aminopeptidase activity was tested in assay buffer (10 mM phosphate buffer pH 7.4, 70 mM NaCl), with 40 µg of oocyst lysates using as substrate the fluorogenic peptide H-Ala-AMC (20 µM final) (Genecust, Luxembourg). Activities were monitored (λ_{ex} = 350 nm, λ_{em} = 450 nm) on a spectrofluorimeter (Photon Technology International, USA). Assays were repeated three times. For inhibition assays, bestatin, 1,10-ortho-phenanthroline or amastatin (1 - 1000 µM) were preincubated for 10 min with the lysate before the addition of H-Ala-AMC. The residual activity was monitored as described above.

Native zymography - Samples were prepared in a native SDS-free and β-mercaptoethanol loading buffer before running on a non-denaturing, 10 % acrylamide mini-gel containing 200 µM of H-Ala-AMC in native condition (6 h, 100 V). The gel was incubated in the assay buffer at 37°C for 10 min before imaging (UV bench) using a Biot-Capt Xpress (Vilber Lourmat, France).

Protein fractionation of oocysts and protease identification by mass spectrometry - Oocysts (5×10^8) were stirred with 0.5 mm glass beads until total destruction of oocyst walls. Pellets were suspended in PBS buffer (10 mM, pH 7.4). Beads were removed and lysates were sonicated as described above. After centrifugation for 30 min 15,000 x g at 4°C, the supernatant was collected (final volume: 10 mL) and was subjected to isoelectric focusing using a 60 mL Rotofor Cell (Bio-Rad Laboratories, USA). The sample volume was brought to 50 mL with water and Bio-Lyte carrier ampholytes, pH range 3 - 10 (Bio-Rad Laboratories, USA) were added at 2.5 % (w/v). This material was loaded into the Rotofor cell and focused at 12 W constant power for 5 h at 3°C. Twenty separate fractions were then harvested and their respective pH values were determined immediately. Enzymatic activities of each fraction against H-Ala-AMC were monitored (20 µM final, λ_{ex} = 350 nm, λ_{em} = 450 nm). Positive fractions were concentrated to a final volume of 1 mL and subjected to size-exclusion chromatography using a TSK G4000PW 600 x 7.5 mm HPLC column (Tosohaas, Cluzeau Info Labo, France) equilibrated with a 150 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4 and a Äktapurifier 10 (GE Healthcare, Orsay, France). Chromatography was performed at 0.5 mL/min and monitored by UV detection at 214 and 280 nm. Forty 0.5 mL fractions were collected and active fractions were concentrated to a final volume of 1 mL. Finally, the sample was loaded on a non-denaturing 10 % acrylamide gel containing 200 µM of H-Ala-AMC for the native zymography assay. After migration at 4°C under non-denaturing conditions, the gel was incubated in the assay buffer at 37°C for 10 min before imaging as described above. The band of interest was excised and sent to the Plate-forme Protéomique de l'Institut Pasteur, Paris, France for protein identification.

RNA extraction and RT-PCR - Oocysts (5×10^7) taken at different times after the initiation of sporulation (0 h, 12 h, 72 h) were blended with 0.5 mm glass beads until the total destruction of oocyst walls. Lysates were treated by the guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform procedure (TRIzol, 1 mL, Invitrogen, USA) for 5 min at room temperature, and total RNA were removed by 20 % chloroform, and precipitated with 50 % isopropanol. Purified 2nd generation merozoites (10^7) and gametocytes (10^6) were directly resuspended in TRIzol (1 mL, Invitrogen, USA). RNA was suspended in nuclease-free water to a final concentration of 1 mg/mL. Aliquots of 1 µg of total RNA were used to reverse transcribe total mRNA using a Poly dT primer and reverse transcriptase II (Invitrogen). Segments of cDNA were amplified using specific primers for *Et*-ApN1 (Fwd: 5'-GTTTTATAGCAA-TCTTATAGTCTTC-3' and Rev: 5'-

CGACCCGCAACGAGGAGCATAC-GC-3') and *Et*-ApN2 (Fwd: 5'-GGCCGCCAC-TTCGCCATTTTC-3' and Rev: 5'-GATGA-GCTACTTTGGACACC-3'); actin (Fwd: 5'-ATCT-TCATCGTAGACGGAGCCAG-3' and Rev: 5'-GTGTGTCCCACACTGTTC-CTATC-3'). The conditions for PCR were 95°C for 1 min, 55°C for 30 s and 72°C for 1 min for 30 cycles using GoTaq DNA polymerase (Promega, USA). Amplification products were loaded onto a 1 % agarose gel stained with ethidium bromide.

Sequencing Et-ApN1 - Full sequence of *Et*-ApN1 was amplified from an *E. tenella* unsporulated oocyst cDNA library. Primers ApN1Fwd (5'- GTTTTATAGCAATC-TTATAGTCTTC-3') and ApN1Rev (5'-CATTGACTGTCCCGTTCTG-TTTGCC-3') were designed from the predicted sequence of *Et*-ApN1 (ETH_00013105) upstream from the predicted start site and downstream from the predicted STOP codon. The *Et*-APN1 fragment was amplified using Phusion High-Fidelity DNA polymerase (New England Biolabs, USA), inserted into pGEM vector (Promega, France) and sequenced. The sequence was submitted to Genbank with the following accession number: KF602061.

Alignment and phylogenetic tree – The alignment of amino acid sequences of *Et*-ApN family members and several selected members of the M1 zinc-metallopeptidases were performed using Cobalt with the following accession numbers: *E. tenella Et*-ApN1 (KF602061), *P. falciparum Pf*A-M1 (XP_001349846.1), *E. coli* ApN (NP_415452.1), *S. cerevisiae* Ala/Arg aminopeptidase (NP_011913.1) and *H. sapiens* ApN (NP_001141.2). The percentage of amino acid identity in the $HEXXHx_{18}E$ region between a given sequence and *Et*-ApN1 was also obtained using Cobalt multi-alignment tool. The phylogenetic tree was computed using MEGA 5 program (Tamura, Peterson *et al.* 2011), with a Muscle alignment and the neighbor joining method. Boostrap values were calculated after resampling 10,000 times. Accession numbers for predicted sequences of *E. tenella Et*-ApN2 (ETH_00015595), *T. gondii Tg*-ApN1 (TGME49_224460), *Tg*-ApN2 (TGME49_224350), *Tg*-ApN3 (TGME49_221310) and *N. canimun Nc*-ApN1 (NCLIV_048230), *Nc*-ApN3 (NCLIV_048240) were obtained from the Toxodb database (http://toxodb.org/toxo/). The new sequence of *E. tenella* N1 (KF602061) was used. Sequences from *C. hominis* (XP_668534.1), *C. parvum* (Xp_627236.1), *P. falciparum* (XP_001349846.1), *P. vivax* (XP_001617047), *P. berghei* (XP_680130.1) and *H. sapiens* (NP_01141.2) were obtained from the NCBI protein database.

Molecular modeling – The *Et*-ApN1 protein showed strong sequence homology with other parasitic aminopeptidase N proteins, in particular from *Toxoplasma*, *Neospora* and *Babesia spp* (~ 50 % sequence identity). Amino acid sequence identity with *Pf*A-M1 from *P. falciparum* was 37 %. To generate a molecular model of *Et*-ApN1, a structure-based sequence alignment was generated using Chimera (Pettersen, Goddard *et al.* 2004) with *E. coli* M1 as the structural template (sequence identity with *E. coli* enzyme was 42 %). Modeller (Eswar, Webb *et al.* 2006) was used to generate a homology model of *Et*-ApN1. The model was subjected to conjugate gradient energy minimization with the program CNS (Brunger, Adams *et al.* 1998). Backbone and side chain atoms were subjected to harmonic restraints. Pymol was used to produce Fig. 4C.

Expression of recombinant Et-ApN1 - A 3.6 kb DNA fragment encoding a partial *Et*-ApN1 (amino acids 242-1093) of 102 kDa was amplified from *E. tenella* unsporulated oocyst cDNA library with primers rApN1Fwd*Bgl*2 (5'-GGGAGATCTCGAA-GAGGACGACCAGGGGAGAAATTC-3') and rApN1Rev*Eco*R1 (5'-GGCTCTGGA-CTCACCTCATTCGTCGCCATGAGAATT CGGG-3') using Phusion High-Fidelity

DNA polymerase (New England Biolabs, USA). The expression vector pBad-*Et*-ApN1, obtained from ligation of the insert after enzymatic restriction using *Bgl*II and *Eco*RI (New England Biolabs, USA) in pBad-HisB vector (Invitrogen, USA), was verified by DNA sequencing. Bacteria were grown in LB at 25°C and induced with 0.002 % of L-arabinose overnight. Recombinant *Et*-ApN1 (*Et*-ApN1r) was purified under non-denaturing conditions following Protino® Ni-NTA agarose batch protocol (Macherey-Nagel, Germany). Purified *Et*-ApN1r was buffer exchanged by dialysis with an 8 kDa cutoff membrane (Spectrum Laboratory, USA) in 1 L of PBS overnight at 4°C. The enzymatic activity was verified using enzymatic assays with H-Ala-AMC and the concentration evaluated with a BCA assay (Bio-Rad Laboratories, USA). Samples were stored at -20°C.

Fingerprint of Et-ApN1r substrates and determination of kinetic parameters - The screening and the determination of K_m, k_{cat} and k_{cat}/K_m were realized as previously described (Drag, Bogyo *et al.* 2010; Poreba, McGowan *et al.* 2012). Briefly, *Et*-ApN1r substrate specificity was assayed against a 61 member library of natural and unnatural amino acid based fluorogenic substrates (supplementary data Table S1). *Et*-ApN1 was assayed in 10 mM phosphate buffer pH 7.4, 70 mM NaCl at 37°C. Each kinetic assay was repeated three times and the average value and standard deviation were calculated. The concentration of DMSO in each experiment was less than 2 %.

Reactivation by metallic cations and inhibitor effects - The ability of metal ions (Zn^{2+}, Cu^{2+}, Co^{2+}, Fe^{2+}, Mn^{2+}, Mg^{2+}) to restore the activity of the *Et*-ApN1r was assessed. Prior to measurement, the recombinant protein was inhibited with 1,10-ortho-phenanthroline (10 mM) for 30 min then dialyzed with assay buffer for 30 min. After verification of the inhibition (remaining activity of 8 % of the initial activity), cations were added (1 - 1000 µM) before addition of H-Ala-AMC (20 µM). For inhibition assays, bestatin, amastatin, E64 and AEBSF (1 - 100 µM) were incubated with *Et*-ApN1r 10 min before addition of H-Ala-AMC (20 µM). The activity was monitored on a spectrofluorimeter and the assay was carried out three times.

Production of polyclonal antibodies against Et-ApN1r - Rabbits were immunized with 100 µg of *Et*-ApN1r in Freund's complete adjuvant and boosted six times at two weeks intervals with 200 µg of *Et*-ApN1r in Freund's incomplete adjuvant. Total sera from rabbits were obtained by centrifugation at 850 x g for 15 min at room temperature. The specificity of polyclonal antibodies (Rα-*Et*-ApN1) was assayed by western blot against *Et*-ApN1r and *E. tenella* oocyst lysates and compared to naive sera.

SDS-PAGE and immunoblotting - Samples were prepared in SDS-PAGE loading buffer containing 2 % v/v of β-mercapthoethanol and boiled for 5 min. Following migration on 10 % SDS-PAGE mini-gels, proteins were transferred to nitrocellulose membrane (Hybond ECL, GE Healthcare, USA). Membranes were blocked with skim milk and incubated with primary antibodies Rα-*Et*-ApN1 (1:500). The goat anti-rabbit antibody coupled with horseradish peroxidase was used as secondary antibody (1:5000, Sigma USA). Immunoblots were revealed with the SuperSignal™ West Pico chemiluminescent substrates according to the supplier (Pierce, ThermoFisher Scientific, USA) and detected using a ChemiSmart5000 (Vilber Lourmat, France).

Immunofluorescence assay - Freshly excysted purified sporozoites (2×10^5) were incubated with 2×10^5 MDBK cells in 24 well plates, for various times (4 - 120 h) at 41°C, 5 % CO_2. For gametes and 2nd generation merozoites, sporozoites were incubated with freshly prepared primary culture of chicken kidney cells (PCKC) as described by Hofmann and Raether (Hofmann and Raether 1990). Cells were

infected using either the *E. tenella* Wis strain (for first step of infection and 2nd generation merozoites production) or the *E. tenella* Wis96 strain, that possesses only one merozoite generation and allows faster gamete formation (96 h instead of 135 h) (McDougald and Jeffers 1976). Infected cells were washed and fixed in 2.7 % (v/v) PFA. Monolayers were then permeabilized with 0.1 % (v/v) Triton X-100, and intracellular parasites were labeled with Rα-*Et*-ApN1 antibody (1:500) and Mα-Enolase antibody (1:1000; constitutive expression with a specificity for the nucleus throughout the intracellular life cycle of *E. tenella*) (Labbé, Péroval *et al.* 2006). Monolayers were incubated with a goat anti-rabbit antibody conjugated with green fluorescent Alexa 488 (1:1000, Invitrogen, USA), a goat anti-mouse antibody conjugated with red fluorescent Alexa 594 (1:1000, Invitrogen, USA) and mounted in Vectashield containing 1.5 µg/mL of DAPI (Clinisciences, France) to label nuclei. Infected cells were examined by fluorescent microscopy (Zeiss Axiovert 200 microscope, Carl Zeiss, Germany).

Statistical analysis – Inter group differences (p value) were evaluated by Student's paired t-test. The significance threshold was set to $p = 0.05$.

Results

Effects of bestatin on *E. tenella* intracellular life cycle

To evaluate the importance of metalloproteases in the *E. tenella* life cycle, we focused on two stages: the intracellular stage with invasion and development of sporozoites and the extracellular stage with the sporulation. We addressed the role of aminopeptidase activity in the development of stable YFP+ sporozoites in MDBK cells model of infection using bestatin, a generic aminopeptidase inhibitor (Fig. 1). After verifying the absence of bestatin cytotoxicity (data not shown), cells were incubated with sporozoites and various concentrations of bestatin (50 - 500 µM) for 4 h, for the invasion assay and 96 h, for the development assay. In the cells without inhibitor, we observed an invasion of MDBK cells by sporozoites at 4 h and the production of merozoites at 96 h illustrating the expected parasitic development. The addition of bestatin to the cells did not impair cell invasion (Fig. 1). However, in contrast, bestatin significantly reduced ($p < 0.001$) the number of merozoites in the medium (40 % and 70 % of inhibition for 100 µM and 500 µM, respectively), in a dose dependent manner. These data show that at least one aminopeptidase is involved and plays a key role in the intracellular development of *E. tenella*.

Detection of aminopeptidase activity during *E. tenella* sporulation

To investigate the expression of aminopeptidase during sporulation, we performed biochemical assays on oocyst lysates isolated at 0, 6, 12, 24, 48 and 72 h after the initiation of sporulation using a specific aminopeptidase substrate, H-Ala-AMC, to analyze the aminopeptidase activity. Aminopeptidase activity was detected in each oocyst lysate during oocyst maturation (Fig. 2A). Sporulation resulted in a significant 1.4 fold increase of the activity at 6 h ($p < 0.001$). Then a continuous decrease of the hydrolysis of H-Ala-AMC was measured up to 48 h to reach a stable value, persisting until oocyst sporulation. In addition, preincubation of unsporulated oocyst lysates with specific metalloproteases inhibitors (bestatin, 1,10-ortho-phenanthroline and amastatin) resulted in a significant dose dependent reduction of aminopeptidase activity (Fig. 2B). Similar results were obtained with sporulated oocyst lysates (data not shown). Taken together, the present data show that one or several neutral aminopeptidases are active during sporulation of *E. tenella*.

Identification of an active aminopeptidase during sporulation

To visualize the activity profile of aminopeptidase during sporulation, we used

native zymographic analysis. Oocyst lysates were loaded on a native acrylamide gel containing H-Ala-AMC substrate. We revealed the presence of a band with an apparent molecular weight of ~ 95 kDa, whose intensity increased gradually during sporulation (Fig. 3A). To identify the active aminopeptidase responsible for this activity, we performed a protein fractionation of an oocyst lysate. The protease activity was followed in parallel during the fractionation process using H-Ala-AMC. Purification revealed that the protease possessed an isoelectric point between pH 5.2 and 5.5 and a molecular weight between 85 and 120 kDa (data not shown) consistent with the observations of zymography. Zymography was used as the last step to allow us to excise the band corresponding to the active protease specifically without silver-staining the gel. Mass spectrometry analysis of the excised gel band, coupled with searches in NCBI and MASCOT alveolata databases, identified the active enzyme as a *T. gondii* aminopeptidase N homologue (M1 family). We searched the genome sequence of *E. tenella* and identified two putative genes that may encode aminopeptidase N proteases (*Et*-ApN) (*Et*-ApN1: ETH_00013105 and *Et*-ApN2: ETH_00015595). Sequence analysis of these putative genes identified that *Et*-ApN1 is the likely active protease. Forty eight peptide fragments obtained by mass spectrometry covered 56.9 % of the *Et*-ApN1 full sequence. In contrast, no hits were detected for *Et*-ApN2 (Fig. 3B).

Amino acid alignment of *E. tenella* aminopeptidases N with other M1 family metalloproteases members

To investigate the homology of *Et*-ApN1 with other aminopeptidase N-like proteases, we cloned and sequenced the gene encoding *E. tenella* aminopeptidase N1. The coding sequence of *Et*-ApN1 was 249 bp longer at the N-terminal end than the predicted sequence (ETH_00013105). An alignment of amino acid sequences was generated using *Et*-ApN2, *T. gondii* and *N. caninum* ApN predicted sequences, the sequence of the M1 metalloproteases from *P. falciparum* and *C. parvum* and the aminopeptidase N sequences of *E. coli, S. cerevisiae* and *H. sapiens* (Fig. 4A). The active site of metalloproteases is characterized by two motifs: (I) the sequence $HExxHx_{18}E$ where the His residues act to coordinate the zinc ion and the first glutamic acid residue is supposedly one of the putative nucleophiles participating in the enzymatic reaction (Rawlings and Barrett 1993) and (Kim, Haraguchi *et al.*) the sequence GAMEN, that appears to distinguish aminopeptidases from leukotriene A4 hydrolase in the M1 family (Rawlings and Barrett 1995). The $HExxHx_{18}E$ motif is located between positions 510-533 for *Et*-ApN1, but is not complete in the predicted sequence of *Et*-ApN2. The GAMEN motif is also conserved in *Et*-ApN1 and is located between positions 474-478. This motif is not found in the predicted sequence of *Et*-ApN2.

The phylogenetic tree showed that *Et*-ApN1 is closely related with the first *T. gondii* aminopeptidases N (*Tg*-ApN1) and aminopeptidase N1 of *N. caninum* (*Nc*-ApN1). It should be noted that these three coccidian parasites possess numerous aminopeptidase N in contrast with *Plasmodium spp.* and *Cryptosporidium spp.* (Fig. 4B**)**. To further investigate the similarities of *Et*-ApN1 to other alanyl aminopeptidases, we generated a homology model of the protein (Fig. 4C). The model shows a typical bacterial alanyl aminopeptidase fold consisting of four domains (Addlagatta, Gay *et al.* 2008). The active site, zinc ion and GAMEN motif are located in domain II. This domain is highly conserved across the M1 superfamily. The model shows good agreement with the *E. coli* enzyme (0.23 r.m.s.d. over 4105 atoms) and the *P. falciparum* enzyme (1.2 r.m.s.d. over 4462 atoms). The three enzymes show most structural variability in the N-terminal domain and the helices of domain IV (Fig. 4C).

Fingerprinting of *Et*-ApN1r activity and comparison with *Plasmodium Pf*A-M1r

As *Et*-ApN1 and *Pf*A-M1 possess similar structures, we investigated their biochemical properties. We produced the fully active *Et*-ApN1 recombinant protein (*Et*-ApN1r) in *E. coli* as described by Ragheb *et al.* (Ragheb, Dalal *et al.* 2011) (Fig. 5). Inhibition assays with generic aminopeptidase inhibitors, bestatin and amastatin, showed a significant dose dependent reduction in *Et*-ApN1r activity ($p < 0.001$ at 1 µM for both inhibitors). No significant effects were observed with cysteine and serine protease inhibitors, E64 and AEBSF respectively (Fig. 6A). We also investigated the capacity of bivalent metal ions to restore the enzymatic activity after ion depletion to determine the requirement for a metal cofactor. *Et*-ApN1r was treated with 1,10-ortho-phenanthroline, resulting in a residual activity of about 8 % compared to the initial activity. Activity was partially restored by the addition of Zn^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+} and Fe^{2+}. The metal ion Zn^{2+}, was the most potent to restore activity. Two ions (Co^{2+} and Cu^{2+}) did not restore activity efficiently (Fig. 6B).

We completed an *Et*-ApN1r fingerprint to assess the specificity of the aminopeptidase for N-terminal amino acids, using a library of natural and unnatural amino acids (Supplementary data Table S1) as previously described (Drag, Bogyo *et al.* 2010; Poreba, McGowan *et al.* 2012) (Fig. 7). The fingerprinting profile obtained showed that the specificity of *Et*-ApN1r was very similar to that of *Pf*A-M1 (Poreba, McGowan *et al.* 2012). The natural amino acid preferred by *Et*-ApN1r is methionine, which showed 76 % of maximal activity (MA). *Et*-ApN1r also cleaved alanine, arginine and leucine (between 32 % and 36 % MA). Glutamine, lysine and tryptophan could be cleaved but at lower rates (~ 15 % MA). Activity against the other natural amino acids was negligible. Analysis of the whole library revealed that *Et*-ApN1r also exhibits a broad spectrum activity against unnatural amino acids, similar to *Pf*A-M1r. hPhe, Nle and hTyr residues are favored at the P1 position compared to methionine (100 %, 95 % and 77 % MA respectively). Substrates with the P1 residues hCha, Nva, hLeu, hArg, Allyl-Gly, and Abu were also hydrolyzed by *Et*-ApN1r (from 35 % to 65 % MA). All other substrates with an unnatural amino acid at the P1 position had an activity less than 30 % MA. Homo-derived residues are accepted somewhat better than their corresponding encoded amino acids thus favoring peptidyl activity (hArg +11 %, hLeu +17 %, hCha +48 % and the best hPhe +98 % MA). This demonstrates that the S1 pocket is deep and bulky.

Further we determined kinetic parameters (Michaelis constant, K_m; catalytic constant, k_{cat}; second-order rate constant, k_{cat}/K_m) of *Et*-ApN1r against a panel of selected amino acids and compared the substrate specificity with *Pf*A-M1r (Table 1). These studies showed that substrate binding affinity is lower for *Et*-ApN1r with K_m values between 16.5 and 59.8 µM (Nle K_m: *Et*-ApN1r 16.5 µM, *Pf*A-M1r 110.1 µM; Nva K_m: *Et*-ApN1r 35.4 µM, *Pf*A-M1r 267.1 µM). *Et*-ApN1r showed slightly higher affinity than *Pf*A-M1r for all tested substrates (Nle, hPhe, hCha, Met, hArg, styryl-Ala, Nva and Ala). Overall, the catalytic rate (k_{cat} values) of *Et*-ApN1r was nearly two fold lower for substrates (Nle k_{cat}: *Et*-ApN1r 0.710 s^{-1}, *Pf*A-M1r 1.399 s^{-1}). The most important difference was observed for Nva (k_{cat} *Et*-ApN1r 0.658 s^{-1} and *Pf*A-M1r 2.786 s^{-1}) with a 4.2 fold decrease. This indicates that the overall catalytic rate of *Et*-ApN1r is lower than *Pf*A-M1r. Specificity constants (k_{cat}/K_m) were always higher with *Et*-ApN1r in comparison to *Pf*A-M1r, suggesting that *Et*-ApN1 is slightly more efficient to hydrolyze substrates than *Pf*A-M1.

Expression and localization profile of *Et*-ApN1 throughout the *E. tenella* life cycle

To address the biological role of *Et*-ApN1, we first examined its expression patterns by RT-PCR on total RNA extracted from oocysts at three different sporulation times: unsporulated (0 h), partially

sporulated (12 h), sporulated (72 h) as well as 2nd generation merozoites and gametes (Fig. 8A). Expression of actin was assessed as a control and was expressed at each time point tested. Among the two tested aminopeptidases *Et*-ApN1 and *Et*-ApN2 genes, *Et*-ApN1 is mainly expressed throughout the sporulation. A light *Et*-ApN1 signal is detected in 2nd generation merozoites and gametes. In contrast, expression of *Et*-ApN2 was detected neither throughout the sporulation nor in 2nd generation merozoites or gametes.

Using the recombinant protein, we produced polyclonal antibody Rα-*Et*-ApN1 to analyze the *Et*-ApN1 profile by western blot at six different time points of sporulation (0, 6, 12, 24, 48 and 72 h) and 2nd generation merozoites (Fig. 8B). The *Et*-ApN1 gene encodes a 1093 amino acids protein with a predicted molecular weight of 121 kDa. By immunoblot, we observed up to five forms of *Et*-ApN1 (120, 100, 96, 68 and 38 kDa) throughout sporulation. In the unsporulated oocyst, we observed the presence of two bands corresponding to the full length *Et*-ApN1 (120 kDa) and an ~ 100 kDa form. Six hours after the beginning of sporulation, an increase of the 120 kDa form is observed suggesting synthesis of *Et*-ApN1. At 12 h, the signal intensity of the 120 kDa form decreased towards a new band of 96 kDa. At 24h, the 96, 68 and 38 kDa forms are predominant. From 48 h, high molecular forms (120, 100 and 96 kDa) decreased, whereas the intensity of the 68 and 38 kDa bands increased. At the end of sporulation, only the 96, 68 and 38 kDa forms of *Et*-ApN1 remained. No signal was detected in 2nd generation merozoites. These data suggest that the 120 kDa form undergoes sequential hydrolysis into the 100, 96, 68 and 38 kDa forms. These results showed that *Et*-ApN1 is synthesized and cleaved throughout sporulation.

To investigate the presence of *Et*-ApN1 in *E. tenella* intracellular life cycle, we localized *Et*-ApN1 within the parasite during its intracellular development. MDBK and PCKC cells were infected with parasites and fixed at different times. MDBK cells and Wis strain sporozoites were used for the first step of development. PCKC cells were used for production of 2nd generation merozoites, as 1st generation merozoites are not able to invade in MDBK cells. As primary culture has a limited life span, we used Wis96 strain sporozoites, which possesses only one generation of merozoites, allowing a faster formation of the gametes. Indirect immunofluorescence assays were performed with polyclonal Rα-*Et*-ApN1r (Fig. 9). Mα-Enolase r was used as control and labeled the parasite nucleus in various stages (Labbé, Péroval *et al.* 2006). At 4 h, *Et*-ApN1 was mainly detected in a punctuated manner in the sporozoite cytoplasm and partially in the nucleus. At 16 h, the majority of *Et*-ApN1 signal co-localized with that of enolase in the nucleus, suggesting that *Et*-ApN1 transited from the cytoplasm to the parasite nucleus. At 24 h, the *Et*-ApN1 signal was still detected in the parasite nucleus but also in the cytoplasm. *Et*-ApN1 was not detected in 2nd generation merozoites. This observation is consistent with the western blot analysis. A strong labeling of *Et*-ApN1 was also observed in both macro and microgametes, with a clear perinuclear labeling of macrogametes.

Discussion

Aminopeptidase M1 activities have been reported in numerous apicomplexan parasites including *Plasmodium* (Florent, Derhy *et al.* 1998), *Toxoplasma* (Berthonneau, Rodier *et al.* 2000), *Cryptosporidium* (Padda, Tsai *et al.* 2002) and *Eimeria* (Fetterer, Miska *et al.* 2005). Studies have confirmed the crucial role of the single M1-family aminopeptidase *Pf*A-M1 in *P. falciparum* metabolism and development (Allary, Schrevel *et al.* 2002; Azimzadeh, Sow *et al.* 2010; Harbut, Velmourougane *et al.* 2011; Ragheb, Dalal *et al.* 2011). Our present work revealed that *Et*-ApN1, *Pf*A-M1 homologue of *E. tenella*, possessed strong homology with the plasmodial enzyme, and may also be involved in the development of *Eimeria*. Not only the sequence and the 3D structure were

similar but also the kinetic parameters, the maturation pattern and the sub-cellular localization, suggesting a strong conservation of aminopeptidase N functions between both apicomplexan species. *Et*-ApN1 has been previously identified as an active protease during sporulation (Fetterer, Miska *et al.* 2005), this observation is reinforced by our results. Fetterer *et al.* suggested that *Et*-ApN1 possibly plays an important function in intracellular stages based on the fact that *Et*-ApN1 was present and active at the end of the sporulation and that aminopeptidases of other apicomplexan parasites are involved in development and metabolism (Fetterer, Miska *et al.* 2005). We took advantage of the numerous studies available on *Pf*A-M1, to assist the interpretation of our results alongside the plasmodial aminopeptidase M1.

The involvement of aminopeptidase activities during *Plasmodium spp.* development was initially illustrated using bestatin (Nankya-Kitaka, Curley *et al.* 1998), a well known inhibitor of aminopeptidases. When the aminopeptidase inhibitor was added to MDBK cells infected by *E. tenella*, a strong inhibition of parasite development was observed, with no effect on the invasion process. This suggests the presence of homologous aminopeptidases in *E.tenella* and their role in development. Previous studies (Chen, Xie *et al.* 2009; Ragheb, Bompiani *et al.* 2009; Harbut, Velmourougane *et al.* 2011; Moon, Kang *et al.* 2011) indicate that, at least, three aminopeptidase homologues involved in *P. falciparum* metabolism and development are present in *E. tenella* genome (Katrib, Ikin *et al.* 2012): two aminopeptidases from the M1 family (*Et*-ApN1 and *Et*-ApN2) and an aminopeptidase of the M17 family (*Et*-Leucyl-aminopeptidase). Interestingly, Fetterer *et al.* showed that only *Et*-ApN1 was transcribed in sporulated oocyst, a relevant stage involved in an early developmental step (Fetterer, Miska *et al.* 2005). Our data reinforce this observation as only *Et*-ApN1 was transcribed in sporulated oocysts. Thus, it seems unlikely that *Et*-ApN2 is active as its predicted sequence lacks both GAMEN and $HExxHx_{18}E$ domains, necessary for protease activity (Ashmun, Shapiro *et al.* 1992; Luciani, Marie-Claire *et al.* 1998). We proposed that *Et*-ApN1 is involved in parasite metabolism and/or development in a similar role to *Pf*A-M1.

It is noteworthy that there is only one aminopeptidase M1 member in *Plasmodium* and *Cryptosporidium,* in contrast to *Toxoplasma*, *Neospora* and *Eimeria*. Complementary phylogenetic analysis should be carried out to determine if gene duplication may have occurred in these parasites. Despite this difference in gene number *Et*-ApN1 and *Pf*A-M1 are very closely related. Structural analysis illustrated similar 3D structures between the two enzymes, which was reinforced by their similar kinetics parameters, their ions requirement and their inhibition profile.

More importantly, our data show similar biological features between the two enzymes. Firstly, both *Et*-ApN1 and *Pf*A-M1 show similar cleavage of the enzymes. Western blot analysis revealed that *Et*-ApN1 is produced as a 120 kDa precursor of which the 96, 68 and 38 kDa proteins could be cleaved forms. These results are highly similar to the cleavage pattern of *Pf*A-M1, synthesized as a 120 kDa precursor and cleaved into three forms of 96, 68 and 35 kDa (Florent, Derhy *et al.* 1998; Allary, Schrevel *et al.* 2002; Azimzadeh, Sow *et al.* 2010; Ragheb, Dalal *et al.* 2011); suggesting a similar cleavage process between *Et*-ApN1 and *Pf*A-M1. The subcellular distribution of *Et*-ApN1 also possesses common features with *Pf*A-M1. The cytoplasmic localization of *Et*-ApN1 is punctuated over all the cytoplasm, coherent with the previous cytoplasmic observation of *Pf*A-M1 (Florent, Derhy *et al.* 1998; Allary, Schrevel *et al.* 2002; McGowan, Porter *et al.* 2009; Azimzadeh, Sow *et al.* 2010). The nuclear localization of *Et*-ApN1 also seems to be conserved with that of *Pf*A-M1 in *Plasmodium* (Dalal and Klemba 2007; Azimzadeh, Sow *et al.* 2010; Ragheb, Dalal *et al.* 2011). The transient increase of *Et*-

ApN1 signal in the nucleus at 16 h suggests a potential role of *Et*-ApN1 inside the nuclear compartment. These data are coherent with the hypothesis proposed by Ragheb *et al.* (Ragheb, Dalal *et al.* 2011) of a potential implication of *Pf*A-M1 in a nuclear process, as observed for other members of the M1-family aminopeptidases (Constam, Tobler *et al.* 1995). Interestingly, the human aminopeptidase N, APN/CD13, has also been localized in the nuclear fraction (Larrinaga, Callado *et al.* 2005) and is involved in cell proliferation (Lendeckel, Kahne *et al.* 1998; Lohn, Mueller *et al.* 2002).

A lingering question is the difference of signal observed between zymography and western blot assays, as both experiments were based on the same samples. One explanation could be that, as the zymogram is made under native conditions, different forms of *Et*-ApN1 migrated at the same relative molecular weight. We believe that the zymographic signal observed might be the sum of signal from the 100 and, 96 kDa forms, observed in western blot analysis. This hypothesis is supported by the mass spectrometry results that identified peptides covering *Et*-ApN1 sequence from 150 to 1093 amino acids, giving a predicted size of 105 kDa. This suggests that the 120 kDa form is not active in zymography. The evolution of the signal also suggested that, the 100 kDa form can not be the only active form in zymogram, as its presence is greatly decreased at 48 and 72 h, although native zymography analysis is not a quantitative assay.

Taken together, our results converge toward the fact that *Et*-ApN1 and *Pf*A-M1 possess similar functions in parasite development. Unfortunately, there is currently no knock-down or RNAi technique available for *E. tenella* to confirm the direct implication of *Et*-ApN1 in parasite development and we can not exclude that other aminopeptidases are also involved in this process. Although we have not yet been able to prove the requirement of *Et*-ApN1 for *E. tenella* development, the results presented in this article clearly show the strong homology between *Et*-ApN1 and *Pf*A-M1. Recently, synthesis of specific bestatin derivate inhibitors showed that the sole inhibition of *Pf*A-M1 is enough to abrogate parasite development (Velmourougane, Harbut *et al.* 2011). Ultimately designing specific inhibitors of *Et*-ApN1 would be an efficient alternative strategy to investigate the aminopeptidase functions. Production of such inhibitors is in progress.

Acknowledgments: We are grateful to Janene Bumstead, Damer Blake, Fiona Tomley (Royal Veterinary College, London) and Thomas Jeffers (University of Arkansas, USA) for kindly providing us with the Wis and Wis96 strain *E. tenella*. We also would like to thank Marilyn Katrib, Philippa A. Sharman, Robert A. Walker and Nicholas C. Smith (University of Technology, Sydney) for kindly providing us with RNA from gametocytes. We thank Julia Chamot-Rooke, Pascal Lenormand and Jean-Claude Rousselle of the Plate-forme Protéomique de l'Institut Pasteur (28 rue du docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15) for the help in mass spectrometry identification. The Drag laboratory is supported by the State for Scientific Research Grant N N401 042838 and the Foundation for Polish Science in Poland. We gratefully acknowledge Robin Beech for checking the English tex

Figure Legends

Table 1. *Enzymatic specificity of Et-ApN1 compared to PfA-M1*. Comparison of the kinetic parameters (K_m, k_{cat}, k_{cat}/K_m) of the selected substrates for *Et*-ApN1r and *Pf*A-M1r (a: adapted from Poreba *et al*., 2012). Values are reported as the mean +/- S.D.

Figure 1. *Bestatin inhibits E. tenella development.* The role of *Et*-ApN1 in invasion (□) and development (■) was assayed by treatment of infected MDBK cells with bestatin. For invasion, cells were fixed 4 h *p.i.* and the percentage of invasion was calculated. For development, supernatants of the cells culture were collected at 96 h *p.i*., and the number of first generation merozoites estimated and compared with a control without inhibitor for determination of the development. Values are reported as the mean +/- S.D. of three independent experiments. Inter group difference (p value) between control and treated condition were evaluated in Student's paired test and significance is indicated with * ($p < 0{,}001$).

Figure 2. *Metalloprotease activity is detected in E. tenella oocyst lysates.*
A, Aminopeptidase activity profile against H-Ala-AMC during sporulation. Proteases activity from oocyst lysates of different sporulation times was recorded using H-Ala-AMC fluoro-peptide. Activity was recorded after incubation of 40 µg of lysates in 10 mM phosphate buffer pH 7.4, 70 mM NaCl, 37°C and addition of 20 µM of H-Ala-AMC. Inter group difference (p value) between unsporulated (0 h) and sporulating oocysts were evaluated in Student's paired test and significance is indicated with * ($p < 0.001$). *B,* Effects of the aminopeptidase inhibitors on the activity. The effect of 1,10-ortho-phenanthroline (□), bestatin (■), and amastatin (■) was assayed against unsporulated oocyst lysate. The lysate was preincubated with the inhibitor before addition of the H-Ala-AMC. Values are reported as the mean +/- S.D. of three independent experiments. Inter group difference (p value) between control and treated conditions were evaluated in Student's paired test and significance is indicated with § ($p < 0.001$) for 1,10-ortho-phenantroline, # ($p < 0.05$) for bestatin and * ($p < 0.001$) for amastatin.

Figure 3. *Aminopeptidase activity profiling and identification of Et-ApN1*
A, Native zymography activity profile during oocyst sporulation. Proteins were separated on a native acrylamide gel containing 200 µM of H-Ala-AMC and observed under UV-light. *B,* Identification of the active aminopeptidase after fractionation and mass spectrometry analysis using *Et*-ApN1 and *Et*-ApN2 sequences. "Hits" are peptide fragments obtained by mass spectrometry. "Coverage" is on *Et*-ApN1 and *Et*-ApN2 full sequence.

Figure 4. *Comparison of aminopeptidases N with Eimeria Et-ApN1*, Multiple alignment of active site (boxed region) and flanking amino acid sequence of *Et*-ApN family members (*Et*-ApN1 KF602061, and *Et*-ApN2 ETH_00015595), and several selected members of the M1 zinc-metalloproteases (*P. falciparum Pf*A-M1 XP_001349846.1, *E. coli* ApN, NP_415452.1; *S. cerevisiae* Ala/Arg aminopeptidase NP_011913.1; *H. sapiens* ApN, NP_001141.2). Identical (*) and conserved (.) amino acids between all sequences are indicated. The position of the conserved putative zinc ion ligands (Z), glutamyl residue required for catalytic activity (C) and the putative proton donor (P) are indicated in bold on the bottom line. The percentage of amino acid identity between a given sequence and *Et*-ApN1, in the boxed region, is indicated in (a). GAMEN and $HExxHx_{18}E$ motifs are in red and blue respectively. *B,* Tree of apicomplexan parasite aminopeptidases N. Tree obtained using MEGA 5 program, Muscle alignment and neighbor joining method with a bootstrap 10,000 of predicted sequences from the Toxodb database of *Eimeria Et*-ApN2 (ETH_00015595), *Toxoplasma* and *Neospora* aminopeptidases N (*Tg*-ApN1: TGME49_224460, *Tg*-ApN2: TGME49_224350, *Tg*-ApN3: TGME49_221310, *Nc*-ApN1: NCLIV_048230, *Nc*-ApN3: NCLIV_048240); sequence of *E. tenella* N1 (KF602061), *Cryptosporidum* and *Plasmodium* zinc-metallopeptidases (*C. hominis*: XP_668534.1, *C. parvum*: Xp_627236.1, *P. falciparum*: Y09081, *P. vivax*: XP_001617047, *P. berghei*: XP_680130.1). Human aminopeptidase N (NP_01141.2) was used as outgroup. ***C*,** Comparison of the *Et*-ApN1 model (in red) with X-

ray crystal structures of *E. coli* ApN (PDB 3B34, in green) and *P. falciparum Pf*A-M1 (PDB 3EBG, in blue). Regions of structural variability are indicated by arrows. Different domains of aminopeptidases are indicated by number (i, ii, iii and iv).

Figure 5. *Recombinant Et-ApN1r purification.* Coomassie blue (CB), immunoblot with anti-His antibody (α-His), native zymography (Zym.) performed with the purified recombinant *Et*-ApN1 6xHis-Tagged. Estimated molecular weight is about 102 kDa. The protein was injected to rabbits to produce poly-clonal antibodies against *Et*-ApN1. Antibodies were assayed against the recombinant protein (α-*Et*-ApN1r).

Figure 6. *Inhibition and cation restoration of Et-ApN1r activity*. *A*, Inhibition of *Et*-ApN1r activity by inhibitors. Purified *Et*-ApN1r was incubated with bestatin (□), amastatin (○), E64 (○) and AEBSF (◇) at different concentrations (1- 100 µM) 10 min before addition of H-Ala-AMC (20 µM). The remaining activity was recorded and expressed as a percentage of the activity of the enzyme incubated without inhibitor and cations. *B*, Restoration of *Et*-ApN1r activity by metals. Purified *Et*-ApN1r was inhibited with 1,10-ortho-phenanthroline and the remaining activity was recorded by addition of H-Ala-AMC. To restore the activity, different concentrations (1 – 1000 µM) of Zn^{2+} (□), Cu^{2+} (△), Co^{2+} (○), Mg^{2+} (○), Mn^{2+} (○), Fe^{2+} (◇) were added. Results are expressed as a percentage of the activity of the enzyme incubated without inhibitor and addition of metal ions. Values are reported as the mean +/- S.D. of three independent experiments.

Figure 7. *Fingerprinting comparison of Et-ApN1r and PfA-M1r substrates.* Individual preferences in S1 pocket of *Et*-ApN1 recombinant enzyme toward natural and unnatural amino acid substrates. Screening of the 61 member natural and unnatural amino acid library. P1 amino acids position preference of *Et*-ApN1r (■) and plasmodial *Pf*A-M1r (□) were compared. On x-axis are the abbreviated amino acid names or number (supplementary data Table S1) and the y-axis are the average relative activity expressed as a percentage of the best amino acid for *Et*-ApN1r activity. Values are reported as the mean +/- S.D. of three independent experiments.

Figure 8. *Transcription and expression profile of Et-ApN1*. *A*, Transcription profile of *Eimeria* aminopeptidase N during the life cycle. RT-PCR were performed on total RNA from three different times of oocyst sporulation; unsporulated (0 h); partially sporulated (12 h) and sporulated (72 h); 2nd generation merozoites (M2) and gametes (Choy, Bryant *et al.*). Actin was used as an internal control. *B*, Maturation of *Et*-ApN1. Oocyst lysates obtained from oocysts isolated at different times after the initiation of sporulation (0, 6, 12, 24, 48, and 72 h) and merozoite lysate (M2) were assessed by immunoblotting with Rα-*Et*-ApN1.

Figure 9. *Et-ApN1 transits through the nucleus within the early step of development.* MDBK or PCKC cells were infected with *E. tenella* Wis or Wis96 (*) strain parasites, respectively and fixed using 2.7 % PAF. Times from 4 up to 24 h were obtained using MDBK infected with Wis strain sporozoites. Second generation merozoites (M2) were obtained using PCKC infected with Wis strain sporozoites. Gametes were obtained using PCKC with Wis96 strain sporozoites (Ma: Macrogamete, Mi: Microgamete). Parasites were dual stained with Mα-Enolase r (nucleus and surface) and Rα-*Et*-ApN1r; cell nuclei were labeled with DAPI.

Table 1.

Substrate	*E. tenella Et*-ApN1r			*P. falciparum Pf*A-M1r[a]		
	K_m µM	k_{cat} s^{-1}	k_{cat}/K_m mM^{-1} s^{-1}	K_m µM	k_{cat} s^{-1}	k_{cat}/K_m mM^{-1} s^{-1}
Nle-AAC	16.5 ± 2.9	0.710 ± 0.030	43.0 ± 0.2	110.1 ± 13.6	1.399 ± 0.119	12.7 ± 0.1
hPhe-AAC	26.2 ± 8.9	0.836 ± 0.056	31.9 ± 0.2	60.8 ± 3.1	0.978 ± 0.003	16.1 ± 0.1
hCha-AAC	23.6 ± 3.9	0.737 ± 0.156	31.3 ± 0.7	96.3 ± 16.2	1.592 ± 0.230	16.5 ± 0.2
Met-AAC	31.4 ± 7.7	0.704 ± 0.180	22.4 ± 0.5	138.2 ± 7.9	0.887 ± 0.077	6.4 ± 0.1
hArg-AAC	27.7 ± 2.2	0.575 ± 0.009	20.8 ± 0.1	124.3 ± 15.6	1.144 ± 0.100	9.2 ± 0.1
styryl-Ala-AAC	30.2 ± 7.0	0.577 ± 0.162	19.1 ± 0.5	192.7 ± 10.5	0.937 ± 0.154	4.9 ± 0.1
Nva-AAC	35.4 ± 12.5	0.658 ± 0.087	18.6 ± 0.2	267.1 ± 7.7	2.786 ± 0.228	10.4 ± 0.1
Ala-AAC	59.8 ± 4.9	0.456 ± 0.033	7.6 ± 0.1	240.6 ± 10.9	1.054 ± 0.154	4.4 ± 0.1

Figure 1.

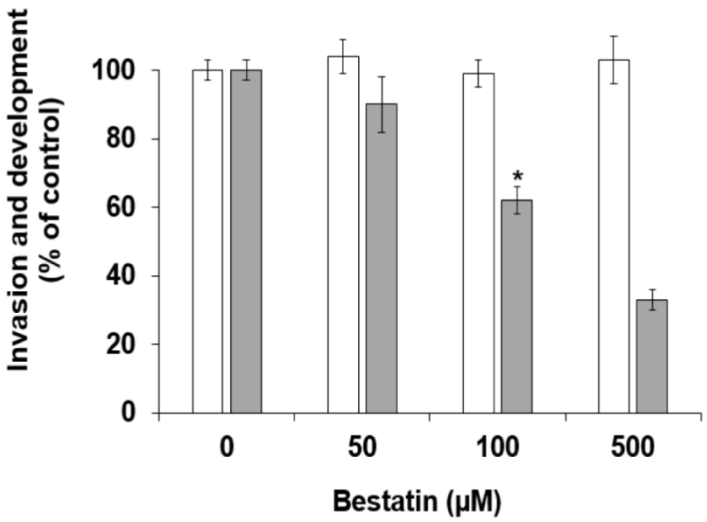

Invasion and development
(% of control)
100
80
60
40
20
0
*
0
50
100
500
Bestatin (μM)

Figure 2.

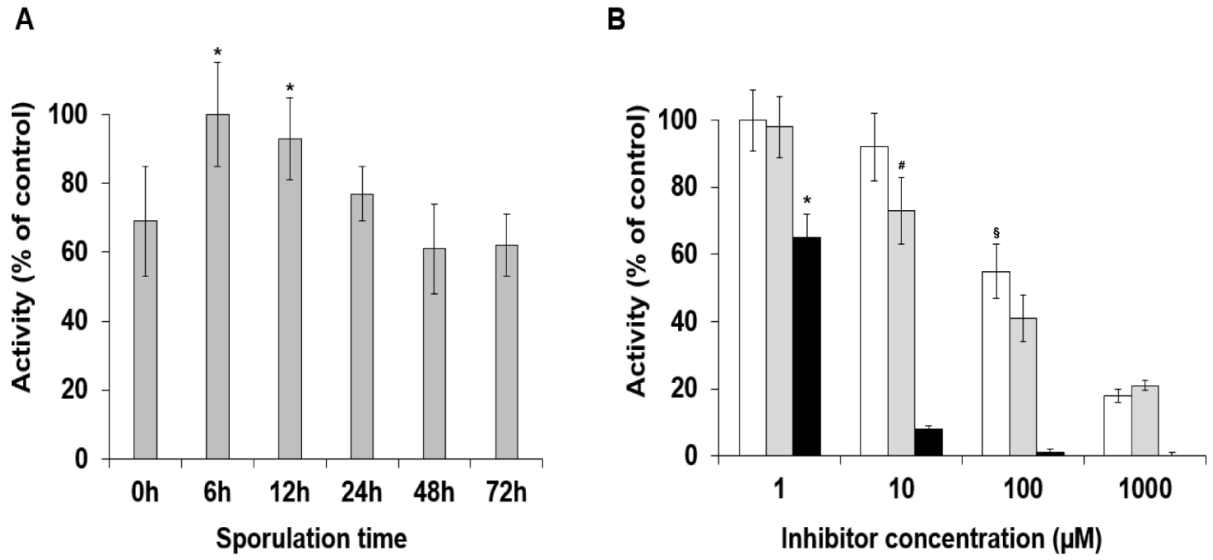
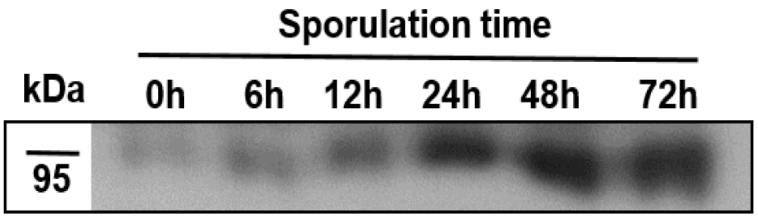

A
Activity (% of control)
100
80
60
40
20
0
*
*
0h
6h
12h
24h
48h
72h
Sporulation time
B
Activity (% of control)
100
80
60
40
20
0
*
#
§
1
10
100
1000
Inhibitor concentration (μM)

Figure 3.

A



B

Identification	Hit numbers	Coverage (%)
Et-ApN1	48	56.90
HSP 70	10	15.40
Enolase	2	7.74

Figure 4.

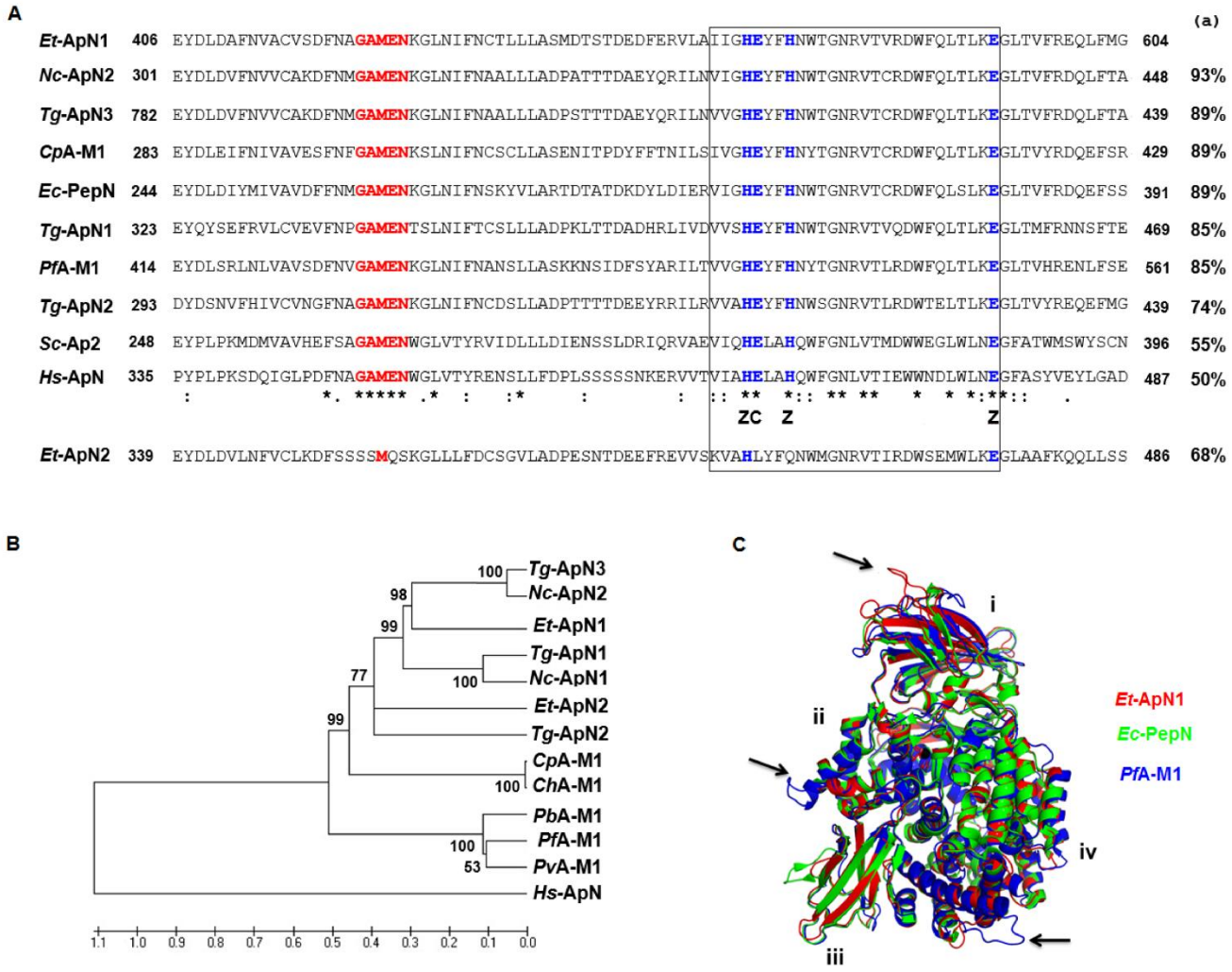

A
(a)
Et-ApN1 406 EYDLDAFNVACVSDFNAGAMENKGLNIFNCTLLLASMDTSTDEDFERVLAIIGHEYFHNWTGNRVTVRDWFQLTLKEGLTVFREQLFMG 604
Nc-ApN2 301 EYDLDVFNVVCAKDFNMGAMENKGLNIFNAALLLADPATTTDAEYQRILNVIGHEYFHNWTGNRVTCRDWFQLTLKEGLTVFRDQLFTA 448 93%
Tg-ApN3 782 EYDLDVFNVVCAKDFNMGAMENKGLNIFNAALLLADPSTTTDAEYQRILNVVGHEYFHNWTGNRVTCRDWFQLTLKEGLTVFRDQLFTA 439 89%
CpA-M1 283 EYDLEIFNIVAVESFNFGAMENKSLNIFNCSCLLASENITPDYFFTNILSIVGHEYFHNYTGNRVTCRDWFQLTLKEGLTVYRDQEFSR 429 89%
Ec-PepN 244 EYDLDIYMIVAVDFFNMGAMENKGLNIFNSKYVLARTDTATDKDYLDIERVIGHEYFHNWTGNRVTCRDWFQLSLKEGLTVFRDQEFSS 391 89%
Tg-ApN1 323 EYQYSEFRVLCVEVFNPGAMENTSLNIFTCSLLLADPKLTTDADHRLIVDVVSHEYFHNWTGNRVTVQDWFQLTLKEGLTMFRNNSFTE 469 85%
PfA-M1 414 EYDLSRLNLVAVSDFNVGAMENKGLNIFNANSLLASKKNSIDFSYARILTVVGHEYFHNYTGNRVTLRDWFQLTLKEGLTVHRENLFSE 561 85%
Tg-ApN2 293 DYDSNVFHIVCVNGFNAGAMENKGLNIFNCDSLLADPTTTTDEEYRRILRVVAHEYFHNWSGNRVTLRDWTELTLKEGLTVYREQEFMG 439 74%
Sc-Ap2 248 EYPLPKMDMVAVHEFSAGAMENWGLVTYRVIDLLLDIENSSLDRIQRVAEVIQHELAHQWFGNLVTMDWWEGLWLNEGFATWMSWYSCN 396 55%
Hs-ApN 335 PYPLPKSDQIGLPDFNAGAMENWGLVTYRENSLLFDPLSSSSSNKERVVTVIAHELAHQWFGNLVTIEWWNDLWLNEGFASYVEYLGAD 487 50%
ZC Z Z
Et-ApN2 339 EYDLDVLNFVCLKDFSSSSMQSKGLLLFDCSGVLADPESNTDEEFREVVSKVAHLYFQNWMGNRVTIRDWSEMWLKEGLAAFKQQLLSS 486 68%
B
Tg-ApN3
Nc-ApN2
Et-ApN1
Tg-ApN1
Nc-ApN1
Et-ApN2
Tg-ApN2
CpA-M1
ChA-M1
PbA-M1
PfA-M1
PvA-M1
Hs-ApN
100
98
99
77
100
99
100
100
53
1.1 1.0 0.9 0.8 0.7 0.6 0.5 0.4 0.3 0.2 0.1 0.0
C
i
ii
iii
iv
Et-ApN1
Ec-PepN
PfA-M1

Figure 5.

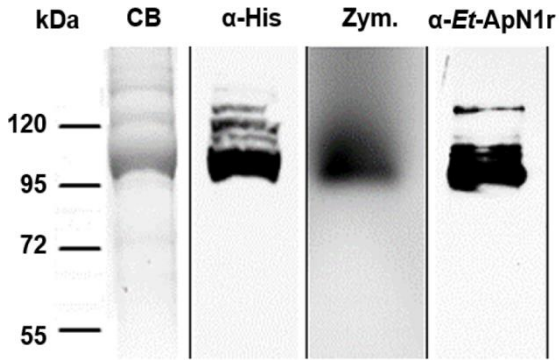


Figure 6.

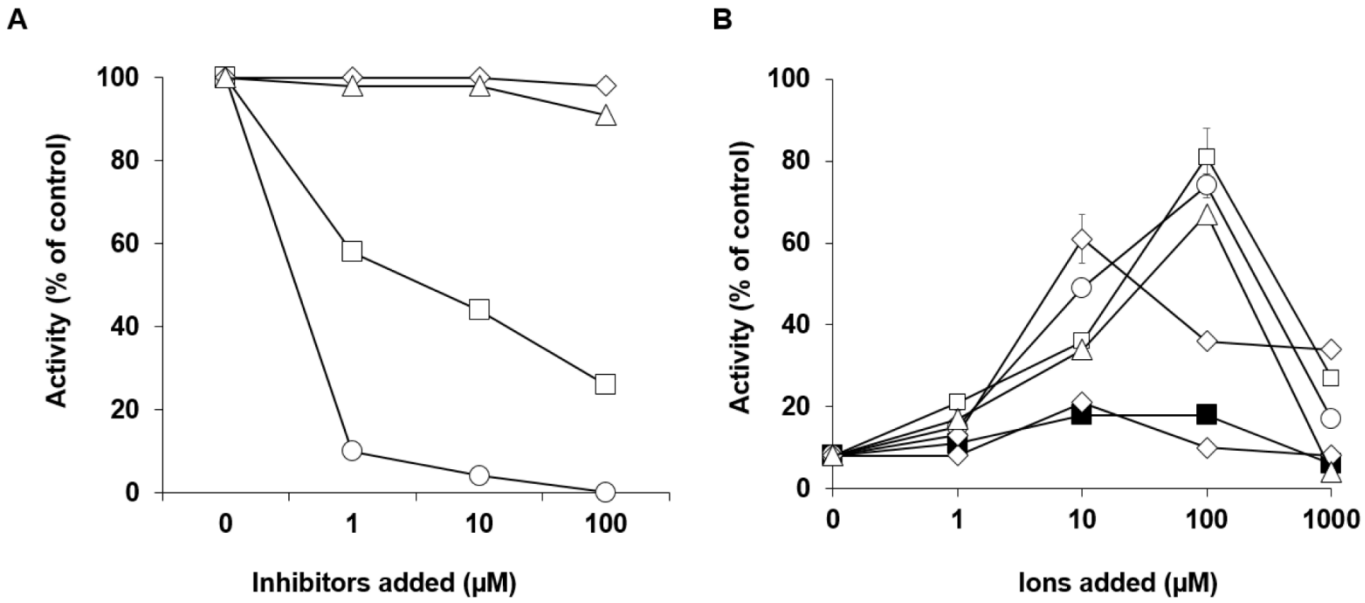

A
Activity (% of control)
100
80
60
40
20
0
0
1
10
100
Inhibitors added (μM)
B
Activity (% of control)
100
80
60
40
20
0
0
1
10
100
1000
Ions added (μM)

Figure 7.

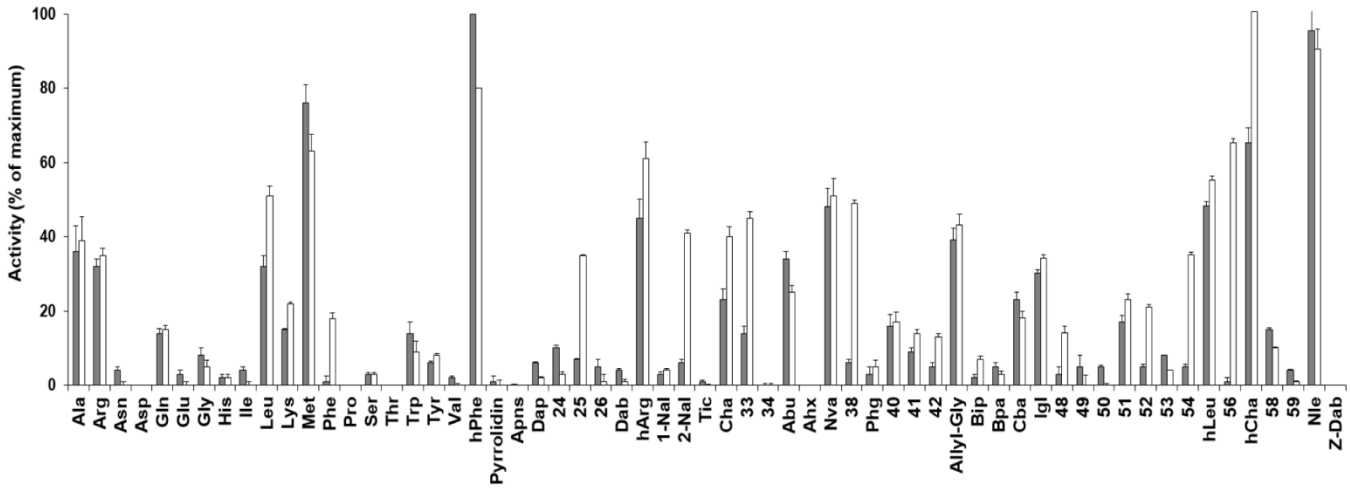

Activity (% of maximum)
100
80
60
40
20
0
Ala
Arg
Asn
Asp
Gln
Glu
Gly
His
Ile
Leu
Lys
Met
Phe
Pro
Ser
Thr
Trp
Tyr
Val
hPhe
Pyrrolidin
Apns
Dap
24
25
26
Dab
hArg
1-Nal
2-Nal
Tic
Cha
33
34
Abu
Ahx
Nva
38
Phg
40
41
42
Allyl-Gly
Bip
Bpa
Cba
Igl
48
49
50
51
52
53
54
hLeu
56
hCha
58
59
Nle
Z-Dab

Figure 8.

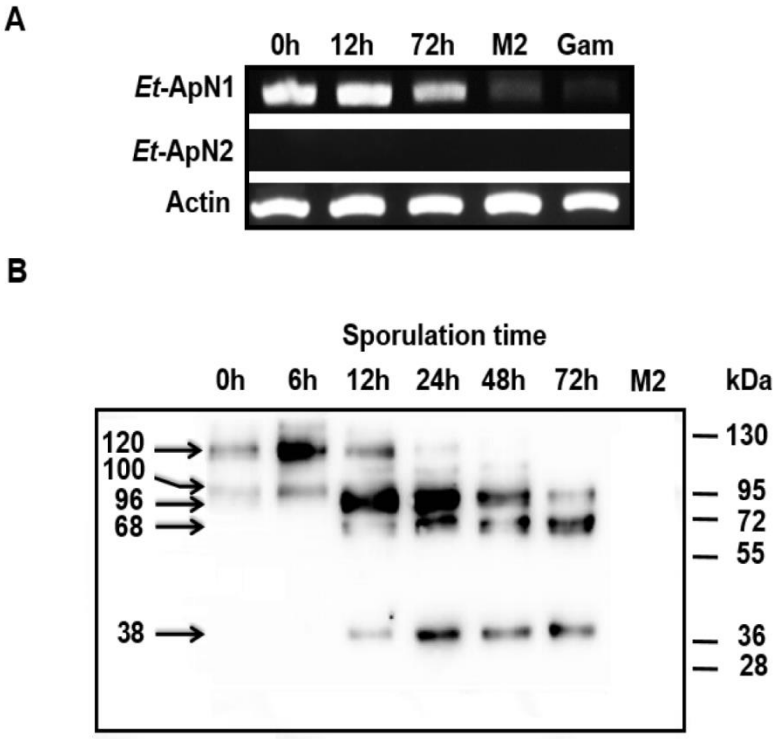
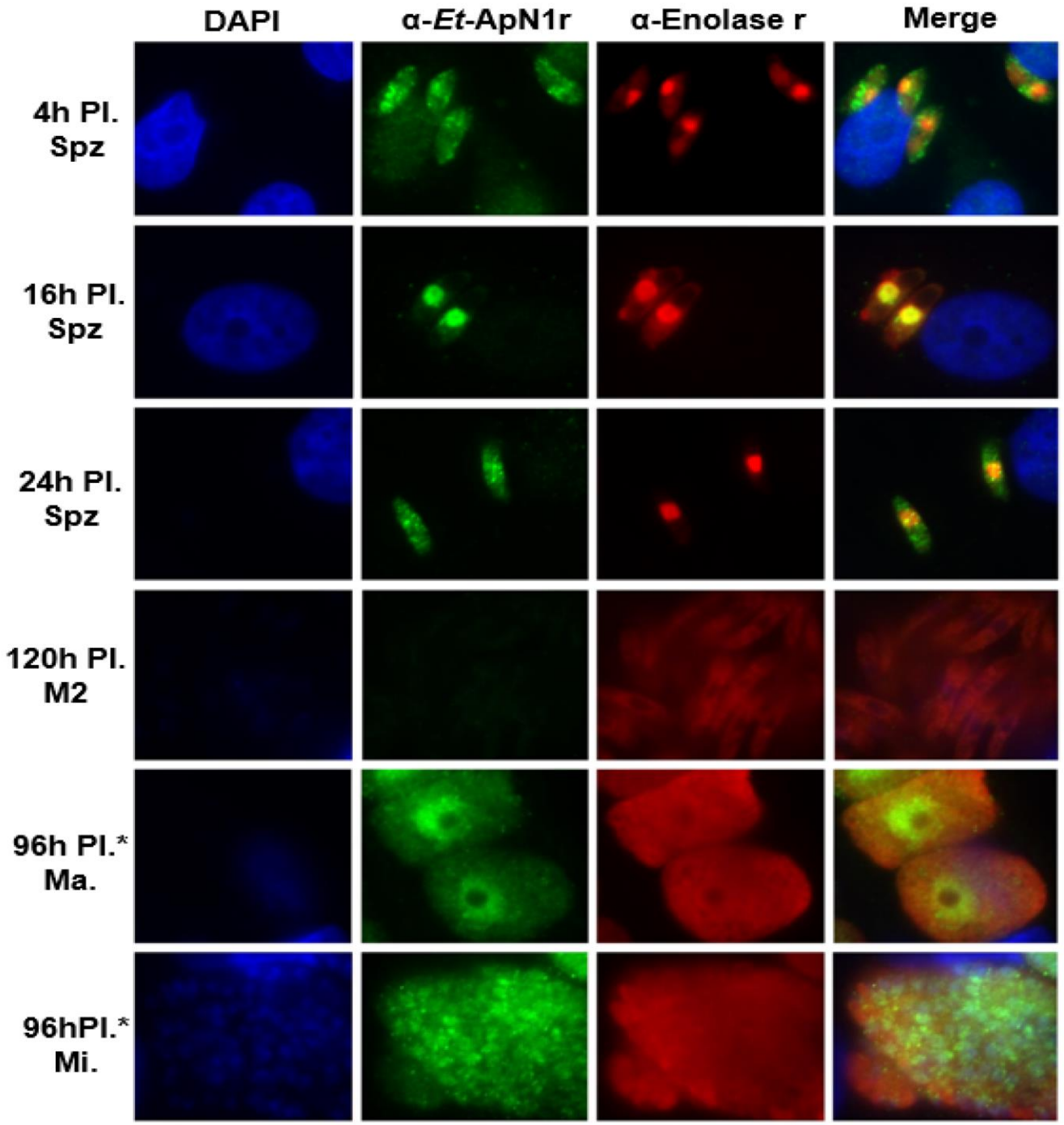

A
0h
12h
72h
M2
Gam
Et-ApN1
Et-ApN2
Actin
B
Sporulation time
0h
6h
12h
24h
48h
72h
M2
kDa
120
100
96
68
38
130
95
72
55
36
28

Figure 9.


DAPI
α-*Et*-ApN1r
α-Enolase r
Merge
4h Pl. Spz
16h Pl. Spz
24h Pl. Spz
120h Pl. M2
96h Pl.* Ma.
96hPl.* Mi.

Simon Gras

Identification et caractérisation de deux aminopeptidases N du parasite apicomplexe, *Eimeria tenella*

Eimeria tenella est l'un des parasites apicomplexes à l'origine de la coccidiose aviaire, l'une des plus importantes maladies parasitaires de l'industrie avicole. Dans le but de caractériser les facteurs de pathogénicité d'*E. tenella*, nous nous sommes intéressés aux protéases et plus particulièrement aux aminopeptidases N. Nous avons caractérisé *Et*-ApN1 et identifié *Et*-ApN3, deux aminopeptidases d'*E. tenella*. *Et*-ApN1 présente de fortes homologies avec *Pf*A-M1, l'homologue de *Plasmodium falciparum*, au niveau des séquences, des structures, des propriétés biochimiques, du clivage et de la localisation. L'ensemble des résultats suggèrent qu'*Et*-ApN1 est impliquée dans le développement parasitaire. Pour évaluer son rôle de cible thérapeutique potentielle, nous avons criblé une bibliothèque de molécules et identifié une nouvelle molécule le C36, qui inhibe directement l'activité d'*Et*-ApN1 et entraîne un arrêt du développement d'*E. tenella in vitro*. Cet effet inhibiteur est également observé chez *Toxoplasma gondii* et *P. falciparum*. Dans le but d'améliorer la solubilité du C36 pour de futures études *in vivo*, le C36 a été pharmaco-modulé. Les perspectives de ces travaux viseront à prouver l'implication directe des *Et*-ApN dans le développement d'*E. tenella.*

Mots clefs : *Eimeria tenella*, Apicomplexe, Coccidiose, Aminopeptidases, Inhibiteurs

Identification and characterization of two aminopeptidases N of the apicomplexan parasite, *Eimeria tenella*

Eimeria tenella is an apicomplexan parasite causing avian coccidiosis, one of the most important parasitic diseases in world poultry industry. To identify *E. tenella* pathogenesis factors, we were interested in proteases and more specifically in aminopeptidases N. We characterized *Et*-ApN1 and identified *Et*-ApN3, two aminopeptidases of *E. tenella*. We revealed strong homologies in the sequences, structures, biochemical properties, cleavage patterns and localization between *Et*-ApN1 and *Pf*A-M1, the homologue from *Plasmodium falciparum*. Taken together, our results suggest that, as *Pf*A-M1, *Et*-ApN1 is involved in parasite development and could be considered as a therapeutic target. To confirm this hypothesis, we screened a small molecule library and identified the compound C36. This molecule not only inhibits *Et*-ApN1 but also the *in vitro* development of *E. tenella*. This inhibition of parasite development was also observed for *Toxoplasma gondii* and *P. falciparum*. In perspectives, a pharmaco-modulation approach will be performed to improve chemical properties of the compound C36. New molecules derived from C36 will then be tested *in vivo.* Future studies will aim to prove the direct implication of *Et*-ApN in *E. tenella* development.

Key words: *Eimeria tenella*, Apicomplexa, Coccidiosis, Aminopeptidases, Inhibitors