



HAL
open science

**Etablissement d'une approche de déconvolution de cibles
pour des composés leishmanicides Ecole Pratique des
Hautes Etudes Mémoire préparé sous la direction de
Gérald Späth, Najma Rachidi et Sylvie Demignot**

Olivier Leclercq

► **To cite this version:**

Olivier Leclercq. Etablissement d'une approche de déconvolution de cibles pour des composés leishmanicides Ecole Pratique des Hautes Etudes Mémoire préparé sous la direction de Gérald Späth, Najma Rachidi et Sylvie Demignot. Biochimie [q-bio.BM]. 2016. hal-01468100

HAL Id: hal-01468100

<https://ephe.hal.science/hal-01468100>

Submitted on 15 Feb 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche

Ecole Pratique des Hautes Etudes

Sciences de la Vie et de la Terre

Etablissement d'une approche de déconvolution de cibles pour des composés leishmanicides



Olivier LECLERCQ

8 décembre 2016

Soutenu devant le jury suivant :

Flore RENAUD, présidente

Gerald SPÄTH, tuteur scientifique

Najma RACHIDI, co-tutrice scientifique

Sylvie DEMIGNOT, tutrice pédagogique

Sébastien POMEL, rapporteur

Christian MITRI, examinateur

Mémoire préparé sous la direction de :

Gerald SPÄTH et Najma RACHIDI

*Unité de Parasitologie moléculaire et signalisation,
Institut Pasteur - INSERM U1201*

Sylvie DEMIGNOT

*Laboratoire de Pharmacologie Cellulaire et Moléculaire
de l'EPHE, Centre de Recherche des Cordeliers*



École Pratique
des Hautes Études



Institut Pasteur

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche

Ecole Pratique des Hautes Etudes

Sciences de la Vie et de la Terre

Etablissement d'une approche de déconvolution de cibles pour des composés leishmanicides



Olivier LECLERCQ

8 décembre 2016

Soutenu devant le jury suivant :

Flore RENAUD, présidente

Gerald SPÄTH, tuteur scientifique

Najma RACHIDI, co-tutrice scientifique

Sylvie DEMIGNOT, tutrice pédagogique

Sébastien POMEL, rapporteur

Christian MITRI, examinateur

Mémoire préparé sous la direction de :

Gerald SPÄTH et Najma RACHIDI

*Unité de Parasitologie moléculaire et signalisation,
Institut Pasteur - INSERM U1201*

Sylvie DEMIGNOT

*Laboratoire de Pharmacologie Cellulaire et Moléculaire
de l'EPHE, Centre de Recherche des Cordeliers*



École Pratique
des Hautes Études



Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Gerald Späth et lui faire part de ma gratitude pour m'avoir permis et donné les moyens de réaliser ce travail visant à l'obtention du diplôme EPHE SVT. Je le remercie également pour son encadrement scientifique, ses conseils, sa disponibilité, son optimisme sans limite et ses réprimandes qui m'ont fait grandir et devenir le technicien que je suis aujourd'hui.

Je tiens également à remercier Najma Rachidi qui m'a encadré tout au long de ce travail malgré le fait que j'ai essayé de la faire virer ! ☺ Je la remercie pour ses conseils, sa disponibilité et le temps qu'elle m'a accordé pour la correction de mon mémoire alors qu'elle était saturée de travail.

Je remercie aussi Sylvie Demignot pour avoir accepté d'être ma tutrice pédagogique, pour ses conseils et ses réunions annuelles qui m'ont permis de présenter mon projet à plusieurs reprises, mais également pour avoir pris le temps de corriger mon mémoire sur son temps libre.

Je souhaite remercier les membres du jury : le Dr Flore Renaud pour sa fonction de présidente, le Dr Sébastien Pomel pour avoir accepté le rôle de rapporteur et le Dr Christian Mitri pour avoir accepté d'être l'examineur de mon travail.

Je remercie beaucoup Eric Prina pour ses conseils, ses corrections illustrées de magnifiques petits Smileys, mais aussi pour son humour, ses tenues vestimentaires improbables et sa taquinerie quotidienne.

Je remercie Pascale Pescher pour tous ses conseils, ses encouragements et sa disponibilité lors de mes nombreuses interruptions dans son travail ou ses réunions.

Je remercie tous les membres passés et présents de VIRPAR/PARSIG pour leur bonne humeur et leur professionnalisme qui font que travailler dans cette unité est un véritable plaisir. Plus particulièrement, je tiens à remercier Christine Maillet pour sa gentillesse de tous les jours, Sophie Veillault le cerbère de l'unité, mais aussi la secrétaire miraculeuse qui trouve réponse à tous les problèmes, Mariko Dachet pour toutes ses merveilleuses discussions à propos de One piece et des films des studios Ghibli, Mathieu Cayla pour les moments de détente avec et sans alcool, Sima Drini pour avoir supporté ma taquinerie quotidienne, Suzanne Lamotte pour avoir souffert avec moi au Penchak Silat et pour m'aider à vider les bouteilles, Laura Piel pour ronchonner autant que moi, si ce n'est même plus, Daniel Martel pour ses blagues légendaires qui me font quotidiennement rire, Thibault Rosazza pour sa taquinerie à la pause-café, Penny Smilris pour ces histoires improbables qui me font toujours rire, Geneviève Milon pour sa gentillesse et sa générosité, Dirk Schimdt-Arras pour m'avoir encadré lors de mes débuts dans l'unité, Miguel Morales pour ses moments footballistiques au labo, Mickaël Guesnon pour avoir tenté, en vain, de me mettre au tapis, Franck Dumetz pour son extravagance de tous les jours, Fatma Guerfali pour sa générosité (y compris en pâtisseries tunisiennes), Eline Rouault-Hardoin pour avoir vidé les verres à ma place, Reiko Watanabe pour sa gentillesse, et finalement je ne remercie pas Hervé Lecoer pour le magnifique surnom qu'il m'a attribué.

Je tiens également à remercier François Rougeon qui m'a permis de travailler à l'Institut Pasteur et s'est battu afin que je sois titularisé.

Je tiens également à remercier ma famille et plus particulièrement mes parents pour m'avoir éduqué convenablement et fait de moi l'homme que je suis aujourd'hui.

Je voudrais également remercier mes enfants, Pénélope et Camille, pour avoir accepté malgré eux que papa ne soit pas là tous les soirs pour s'occuper d'eux.

Et pour finir je tiens à remercier mon épouse Delphine sans qui tout cela n'aurait pu être possible, tu as tout géré à la maison et encaissé sans broncher (quoique pas toujours ☺), afin que je puisse terminer mon travail. Et pour cela, je crois qu'une vie entière à tes côtés ne sera pas suffisante pour te remercier. Idem.

Contenu

Sommaire

Remerciements	1
----------------------	----------

Contenu **2**

Sommaire	3
Table des figures	6
Listes des tableaux et des annexes	7
Abréviations	8

Introduction **10**

I. La leishmaniose **12**

1. Les formes cliniques	12
1.1. La leishmaniose cutanée	12
1.2. La leishmaniose cutanée diffuse	12
1.3. La leishmaniose muco-cutanée	12
1.4. La leishmaniose viscérale	12
1.5. La leishmaniose dermique post-kala-azar	13
2. L'hôte vecteur : le phlébotome	13
3. Le parasite : <i>Leishmania</i>	14
3.1. Taxonomie	14
3.2. Caractéristiques morphologiques de <i>Leishmania</i>	14
3.3. Cycle de vie	15

II. Contrôle de la maladie **16**

1. Diagnostic, détection, prévention, contrôle et vaccination	16
2. Les médicaments leishmanicides	16
2.1. L'état actuel de la thérapie	16
2.2. Résistance des parasites	17

III. Découverte de médicaments leishmanicides et déconvolution de cibles **18**

1. Choix des cibles pour la découverte de médicaments leishmanicides	18
1.1. Génome et transcription	18
1.2. Différenciation et phosphorylation	18
1.3. Les kinases	19
1.4. Les inhibiteurs de kinases	19
2. Approches de criblage et méthodes de déconvolution de cibles	20
2.1. L'approche de criblage ciblée et l'approche phénotypique dans la recherche de nouveaux médicaments ...	20

2.2. Etat de la découverte de nouveaux médicaments leishmanicides	21
2.3. Méthodes de déconvolution de cibles	22
2.4. Etat de la déconvolution de cibles chez <i>Leishmania</i>	23
2.5. Conclusion	24
3. Projet de diplôme EPHE SVT	24

Matériel & méthodes 26

I. Matériel 26

1. Tampons, milieux et solutions commerciales	27
2. Anticorps	31
3. Organisme : <i>Leishmania</i>	31
4. Logiciels	31

II. Méthodes 32

1. Biologie cellulaire	32
1.1. Culture de promastigotes	32
1.2. Différenciation de promastigotes en amastigotes axéniques	32
2. Biochimie	32
2.1. Extraction des protéines totales	32
2.2. Quantification des protéines	32
2.3. SDS-PAGE	32
2.4. Coloration au bleu de Coomassie	32
2.5. Coloration SYPRO Ruby	32
2.6. Western blot	32
2.7. Purification des protéines de liaison à la Staurosporine	33
2.8. « In-Gel kinase Assay » (IGKA)	33
2.9. Chromatographie d'affinité à l'ATP	33
2.10. 2D-DiGE	34
2.11. Test d'activité kinase <i>in vitro</i> (IVKA)	34

Résultats 35

I. Déconvolution des cibles de composés avec le « Staurosporine Capture Compound » 37

1. La technologie « Staurosporine Capture Compound »	37
2. Enrichissement des protéines de liaison à la Staurosporine	37
3. Révélation de l'activité des kinases purifiées	38
4. Approche comparative CCMS	38
5. Conclusion	39

II. Déconvolution des cibles de composés par chromatographie d'affinité à l'ATP	41
1. Enrichissement de l'ATPome de <i>L. donovani</i>	41
1.1. Purinome et ATPome	41
1.2. Chromatographie d'affinité à l'ATP	41
1.3. Visualisation des protéines capturées avec les ATP-Agaroses	42
1.4. Validation des protéines capturées par compétition à l'ATP	42
1.5. Identification des protéines capturées avec les ATP-Agaroses	43
2. Optimisation de la chromatographie d'affinité à l'ATP	44
2.1. Détermination des conditions de lyse des parasites	44
2.2. Chromatographies d'affinité à l'ATP successives	47
3. Enrichissement et analyse de l'ATPome de <i>Leishmania donovani</i>	48
3.1. Enrichissement de l'ATPome	48
3.2. Protéome de <i>L. donovani</i> LD1S	49
3.3. Analyse de l'ATPome	50
3.4. Analyses bio-informatiques	51
3.5. Conclusion	52
4. Détermination de la spécificité des composés issus des criblages	53
4.1. Chromatographie d'affinité à l'ATP compétitive	53
4.2. Détermination de la spécificité de composés par 2D-DIGE	55
4.3. Optimisation de la détermination de la spécificité de composés par 2D-DiGE	57
4.4. Détermination de la spécificité de composés issus des criblages	59
4.5. Conclusion	60
Discussion	61
Discussion & Perspectives	62
Annexes	63
Bibliographie	63

Table des figures

1. Statut d'endémicité de la leishmaniose dans le monde en 2012	12
2. Les aspects cliniques de la leishmaniose	13
3. Cycles de transmission de <i>Leishmania</i>	13
4. Le phlébotome	14
5. Visualisation en microscopie électronique à balayage de <i>Leishmania donovani</i>	14
6. Représentation schématique des deux stades principaux de <i>Leishmania</i>	15
7. Cycle de vie de <i>Leishmania</i>	15
8. Diagnostic et traitements de la leishmaniose	16
9. Analyse pondérée de l'impact du changement climatique sur les risques de maladies infectieuses en Europe	17
10. Organisation génique et maturation des messagers chez <i>Leishmania</i>	18
11. Comparaison des ePKs entre l'homme et <i>L. major</i>	19
12. Les approches phénotypiques et ciblées pour la découverte de médicaments	20
13. Répartition des nouveaux médicaments découverts entre 1999 et 2008	21
14. Les méthodes génétiques pour la déconvolution de cibles	22
15. Les méthodes biochimiques pour la déconvolution de cibles	23
16. Criblage de composés par « High Content Analysis »	24
17. Purification des protéines de liaison à la Staurosporine utilisant le « Capture compound »	37
18. Analyse des protéines capturées avec le « Staurosporine Capture Compound »	38
19. Protéines identifiées par CCMS et analyse fonctionnelle	39
20. Représentation des motifs de liaison à la Staurosporine	39
21. Purification des protéines de liaison à l'ATP en utilisant l'ATP-Agarose	41
22. Visualisation et caractérisation des protéines capturées avec l'ATP-Agarose	42
23. Validation des protéines capturées par compétition à l'ATP	43
24. Identification des protéines capturées avec l'ATP-Agarose	44
25. Détermination des conditions de lyse et de la limite de saturation de l'ATP-Agarose	45
26. Optimisations de la chromatographie d'affinité à l'ATP successive	47
27. Enrichissement de l'ATPome par chromatographie d'affinité à l'ATP successive	48
28. Analyse comparative des protéines identifiées dans l'ATPome et le protéome	50
29. Chromatographie d'affinité à l'ATP compétitive	54
30. Comparaison par 2D-DiGE des produits issus d'une chromatographie d'affinité à l'ATP	55
31. Détermination de la spécificité de composés par 2D-DiGE : Preuve de principe	56
32. Optimisation de la 2D-DiGE	57
33. Analyse de résultats de la figure 32E avec le logiciel SameSpots	58
34. Détermination de la spécificité des composés issus des criblages	59

Listes des tableaux et des annexes

Tableaux

I. Les sous-genres de <i>Leishmania</i> identifiés chez l'homme	14
II. Groupes et familles des ePKs dans les Trypanosomatidés	19
III. Tampons, milieux et solutions commerciales	27
IV. Les anticorps	31
V. Programmes pour Ettan IPGphor 3	34

Annexes

1. Liste des 70 protéines spécifiquement capturées par le SCC	67
2. Liste des kinases capturées avec la chromatographie d'affinité à l'ATP	68
3. Liste des kinases identifiées dans les protéomes et les ATPomes	69
4. Résultats de l'analyse des protéines hypothétiques par Protein BLAST	71
5. Résultats de l'analyse des protéines hypothétiques sans domaine connu avec Phyre2	74
6. Structure de composés issus des criblages ciblés et phénotypiques	80
7. Enrichment of <i>Leishmania donovani</i> ATP-binding proteins using a staurosporine capture compound	81

Abréviations

α	Anti	FDA	Food and Drug Administration
°C	Degré Celsius	g	Gravitational constant
μM	Micro Molaire	GeLC-MS/MS	Gel electrophoresis followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry
2D	Deux dimensions	GO	Gene Ontology
2D-DiGE	2D fluorescence difference gel electrophoresis	GSK3	Glycogen synthase kinase 3
ABP	Activity-Based Probe	GST	Glutathion S-transférase
Ac	Anticorps	GTP	Guanosine triphosphate
ADN	Acide désoxyribonucléique	h	Heure(s)
ADNc	ADN complémentaire	HCA	High Content Assay
aPKs	Protéines kinases atypiques	HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
ARN	Acide ribonucléique	HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ARNm	ARN messenger	HRP	Horse radish peroxidase
ATP	Adénosine triphosphate	HRP4	HSP related protein 4
BSA	Bovine serum albumin	HSP	Heat shock protein
CAMK	Calcium/calmodulin dependent protein kinase	id.	Idem (identique)
CC	Capture Compound	IGKA	in gel Kinase Assay
CCMS	Capture Compound Mass Spectrometry	IVKA	<i>in vitro</i> Kinase Assay
CK1	Casein kinase 1	kDa	Kilo Daltons
CLK	Dual specificity protein kinase	L.	<i>Leishmania</i>
Cos-Seq	Cosmid Sequencing	LC	Leishmaniose cutanée
CST	Cell Signaling Technology	LC-MS/MS	Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry
DAT	Direct agglutination test	LV	Leishmaniose viscérale
DARTS	Drug Affinity Responsive Target Stability	LDPKA	Leishmaniose dermique post-kala-azar
DMSO	Dimethyl sulfoxide	M	Molaire
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline	M199	Medium 199
DTT	DL-Dithiothreitol	mA	Milli Ampères
DYRK	Dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase	MAPK	Mitogen-activated protein kinase
ECL	Enhanced chemiluminescent	Mb	Mégabases
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control	MBP	Myelin basic protein
EDTA	Ethylenediamine tetra acetate	mM	Milli Molaire
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	min	Minute(s)
eIF2α	Eukaryote translation initiation factor 2 alpha	MS	Mass spectrometry
ePKs	Protéines kinases eucaryotes	NME	Nouvelles entités moléculaires
ex	Exemple	OMS	Organisation mondiale de la santé
		PBS	Phosphate buffered saline
		pH	Potentiel hydrogène

Contenu – Abréviations

PVDF	Polyvinylidene difluoride
RPMI	Roswell Park Memorial Institute tissue culture medium
s	Seconde(s)
SA	Sigma Aldrich
SAR	Structure Activity Relationship
SCC	Staurosporine Capture Compound
SDC	Déoxycholate de Sodium
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SL	Splice Leader
SMC	Structural Maintenance of Chromosomes
SVF	Sérum de veau fœtal
SPROX	Stability of Proteins from Rates of Oxidation
TBS	Tris-buffered saline
TDR	Research and Training in Tropical Diseases
TK	Tyrosine kinase
TKL	Tyrosine kinase-like
tr/min	Tour par minutes
UV	Ultraviolet
V	Volt
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VP	vacuole parasitophore

Introduction

Les maladies tropicales négligées

Les maladies tropicales négligées (MTN) sont un groupe de maladies transmissibles qui sévissent dans de nombreux pays en voie de développement, et en particulier dans les populations pauvres vivant dans les zones rurales et urbaines défavorisées. Aujourd'hui, les MTN sont un important problème de santé publique et gâchent la vie d'environ un milliard de personnes dans le monde, tout en mettant en péril la santé de plusieurs millions d'autres gens. Elles peuvent entraîner la cécité, une incapacité, des déformations ou d'autres handicaps favorisant la discrimination, la pauvreté, et sur le long terme ont un effet négatif sur la productivité économique d'un pays. Les MTN sont causées par des agents pathogènes tels que les protozoaires (Leishmaniose, Maladie du sommeil...), les helminthes (Dracunculose, Echinococcose...), les bactéries (Trachome, Lèpre...) ou les virus (Dengue, Rage).

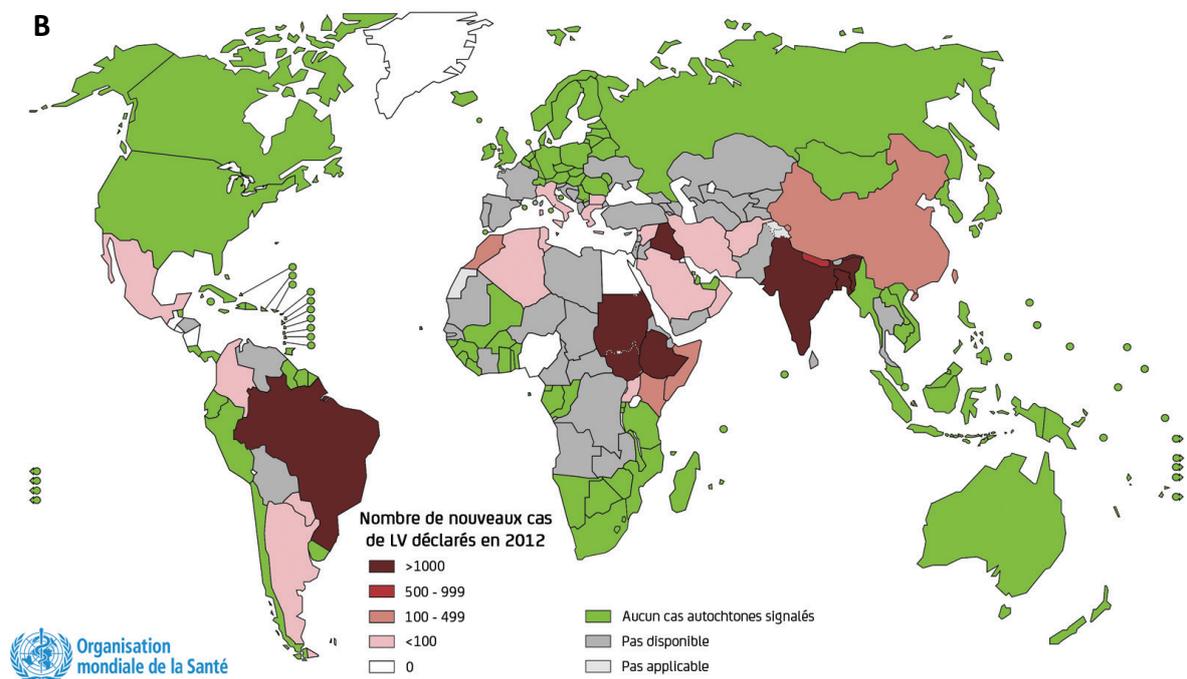
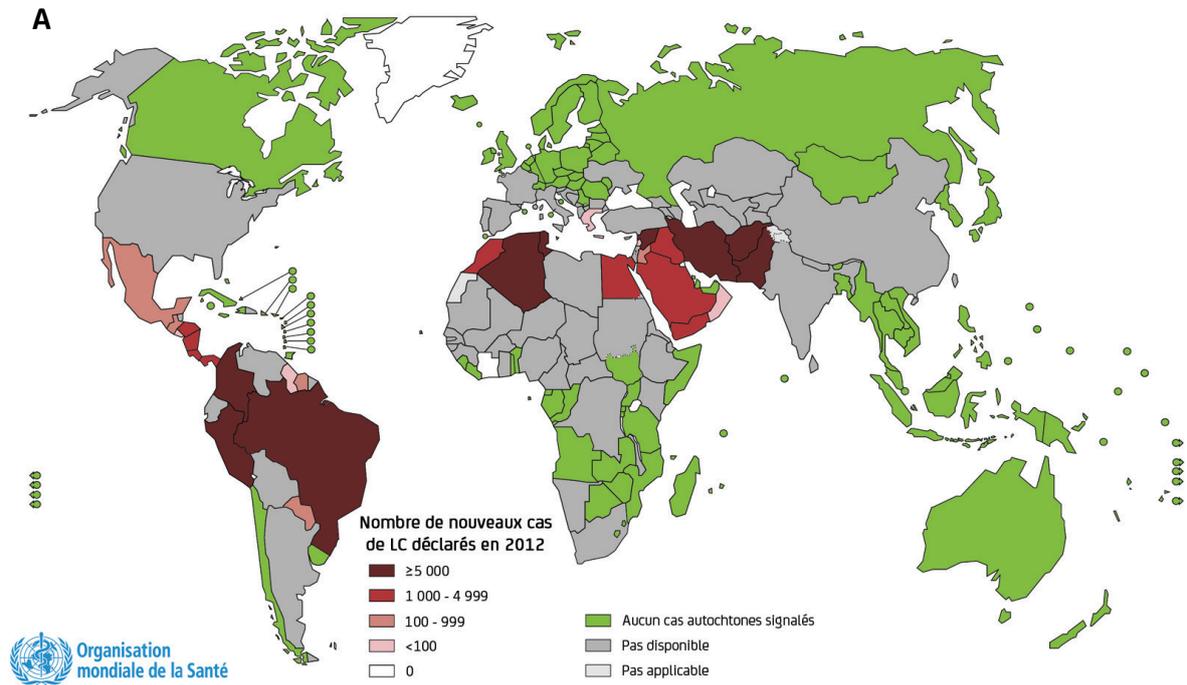


Figure 1. Statut d'endémicité de la leishmaniose dans le monde en 2012

Le code couleur correspond au nombre de nouveaux cas déclarés en 2012 (voir légende). **(A)** Carte du statut d'endémicité de la leishmaniose cutanée. **(B)** Carte du statut d'endémicité de la leishmaniose viscérale.

(http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/).

I. La leishmaniose

La leishmaniose est une maladie à manifestation cutanée et/ou viscérale due à différentes espèces de protozoaires flagellés appartenant au genre *Leishmania* de la famille des *Trypanosomatidae*. Ces protozoaires sont transmis à des hôtes, réservoirs ou non, lors du repas sanguin de certaines espèces de phlébotomes. Etant donné la diversité des espèces et des réponses immunitaires, la leishmaniose se décline sous différentes formes.

1. Les formes cliniques

1.1. La leishmaniose cutanée

La leishmaniose cutanée (LC) est la plus répandue à travers le monde avec près de 58 000 cas par an selon les sources officielles (Figure 1A). Toutefois, étant donné le manque d'institutions chargées de la surveillance de cette maladie dans les pays concernés, ce chiffre est très largement inférieur à la réalité, et on peut estimer que chaque année 0,7 à 1,2 millions de personnes sont infectées. Aujourd'hui, 95% des cas de LC sont diagnostiqués en Amérique du sud et centrale, dans le bassin méditerranéen et du Moyen-Orient à l'Asie centrale. Les dix pays avec le nombre le plus élevé de cas estimé sont : l'Afghanistan, l'Algérie, la Colombie, le Brésil, l'Iran, la Syrie, l'Éthiopie, le nord du Soudan, le Costa Rica et le Pérou. Ils représentent à eux seuls, près de 70 à 75% des cas répertoriés (Alvar et al., 2012).

La maladie est causée par différentes espèces de *Leishmania* en fonction du continent : *L. tropica*, *L. major* et *L. aethiopica* dans l'Ancien Monde (Europe, Afrique, Moyen orient, Asie) et *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. peruviana* dans le Nouveau Monde (Amériques). Les aspects cliniques de la LC se caractérisent par une papule ou un nodule (petit bouton rouge) au site d'inoculation par le phlébotome, qui se transforme lentement en une croûte, puis en ulcère pouvant mesurer jusqu'à 5 cm de diamètre. Sans traitement, cet ulcère fini généralement par guérir progressivement au fil des mois ou des années, laissant une cicatrice profonde avec une pigmentation altérée (Figure 2A). Toutefois, il faut noter que ces aspects cliniques peuvent varier selon l'espèce de *Leishmania* impliquée (Tableau I) et le cycle de transmission (Figure 3), mais également en fonction du statut immunitaire et génétique des patients. Par exemple, la LC causée par *L. tropica* se retrouve principalement en zone urbaine et possède une période d'incubation de 2 à 8 mois. Elle produit fréquemment de multiples ulcères indolores qui

finissent par guérir spontanément au bout d'un an. A contrario, la LC causée par *L. major* est principalement rurale et se caractérise par une période d'incubation inférieure à 4 mois et par des lésions généralement très inflammées et ulcérées qui mettent entre 2 à 8 mois pour guérir (WHO, 2010).

1.2. La leishmaniose cutanée diffuse

La leishmaniose cutanée diffuse est causée par *L. aethiopica* dans l'Ancien Monde et *L. mexicana*, *L. amazonensis* dans le Nouveau Monde. Elle se caractérise par l'apparition de macules, papules, nodules ou plaques disséminés sur la totalité du corps sans aucune ulcération et donne un aspect de lépreux aux patients (Figure 2E). Cette maladie qui apparait principalement chez les patients avec un système immunitaire déficient, ne guérit pas spontanément et ne répond pas bien au traitement. De plus, les rechutes sont fréquentes et le traitement s'avère alors inefficace en raison de la persistance de parasites résistants au traitement (WHO, 2010).

1.3. La leishmaniose muco-cutanée

La leishmaniose muco-cutanée est principalement causée par *L. braziliensis* et *L. panamensis*. Aujourd'hui, 90% des cas de leishmaniose muco-cutanée surviennent au Brésil, en Bolivie et au Pérou. Elle peut mettre plusieurs mois voire plusieurs années avant de se manifester par la dégradation progressive des muqueuses de la bouche et des voies respiratoires supérieures. Lors de la phase finale, les patients peuvent être atteints de graves mutilations faciales telles que la destruction du nez, du pharynx et du larynx (Figure 2B) (WHO, 2010).

1.4. La leishmaniose viscérale

La leishmaniose viscérale (LV) est principalement causée par *L. donovani* sur le sous-continent indien et en Afrique de l'Est, par *L. infantum* dans le bassin méditerranéen, et par *L. chagasi (infantum)* dans le Nouveau Monde. Elle est endémique dans 62 pays



Figure 2. Les aspects cliniques de la leishmaniose

(A) Leishmaniose cutanée. (B) Leishmaniose cutanéomuqueuse. (C) Leishmaniose viscérale. (D) Leishmaniose dermique post-kala-azar. (E) Leishmaniose cutanée diffuse.

(http://www.who.int/leishmaniasis/clinical_forms_leishmaniasis/en/ ; <http://itg.content-e.eu/Generated/pubx/173/leishmaniasis/general.htm>).

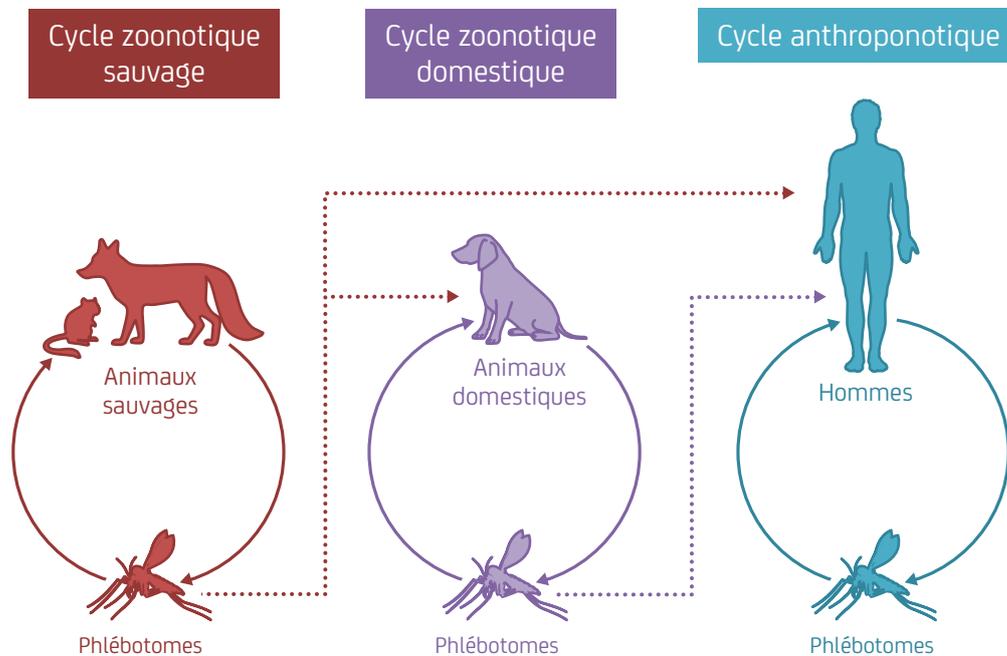


Figure 3. Cycles de transmission de *Leishmania*

La leishmaniose peut être classée selon le cycle de la source de l'infection humaine : zoonotique sauvage (rouge) ou domestique (violet) lorsque l'animal est la seule source d'infection pour le vecteur, et anthroponotique (turquoise) lorsque l'homme est la seule source d'infection pour le vecteur.

avec un total de 200 millions de personnes à risque et 220 000 cas par an officiellement répertoriés (Figure 1B). Toutefois, les données étant issues d'études épidémiologiques incomplètes, on peut estimer que 0,2 à 0,4 millions de personnes sont infectées chaque année. Plus de 90% des cas de LV se produisent dans six pays : l'Inde, le Bangladesh, le Népal, le Soudan, le Brésil et l'Éthiopie. On constate également, que les déplacements de population provoqués par les guerres, les sécheresses, les famines ou les migrations rurale-urbaine contribuent à la réapparition et à la dissémination de la maladie en Inde et au Brésil (Alvar et al., 2012; Guerin et al., 2002).

Les symptômes et les aspects cliniques de la LV sont variables selon l'espèce de *Leishmania* impliquée (Tableau I), le cycle de transmission (Figure 3) et le statut de la maladie :

- Endémique, qui affecte une population de manière habituelle.
- Sporadique, qui affecte seulement quelques individus au sein d'une population, sans qu'il se forme une chaîne de transmission continue.
- Epidémique, qui se répand à la façon d'une épidémie ; contagieux.

Dans les zones endémiques, la LV tend à être relativement chronique et les enfants sont souvent les plus touchés. Le groupe d'âge le plus touché par la LV causée par *L. infantum* est de 1 à 4 ans en Asie centrale, Afrique du Nord et de l'Ouest, et de 1 à 10 ans dans le Nouveau Monde. Toutefois, il existe également de nombreux cas chez les adultes dans les foyers d'introduction récente dans le Nouveau Monde. La période d'incubation varie de 10 jours à plus d'une année, et l'apparition de la maladie est habituellement progressive. Les symptômes les plus courants sont la fièvre, les malaises, les frissons, la perte de poids (cachexie) et des douleurs abdominales. Les signes cliniques sont la splénomégalie, avec ou sans hépatomégalie, la pâleur des muqueuses, et dans certains cas, souvent observés au Soudan, la lymphadénopathie peut être la seule manifestation clinique (Figure 2C). En Inde, on peut également observer un assombrissement de la peau du visage, des mains, des pieds et de l'abdomen d'où le nom hindi de « Kala-azar » (fièvre noire). La LV sporadique peut survenir chez les personnes non autochtones de tous âges qui entrent dans une zone endémique. Ces cas peuvent être aigus, avec l'apparition brutale de fièvre entre trois

semaines et deux ans après l'infection. La maladie peut progresser rapidement avec des frissons, une fièvre ondulante élevée (2 pics par jour), des sueurs profuses, une perte de poids rapide et des malaises. De plus, ces patients sont plus susceptibles de développer des complications rares (anémie hémolytique aiguë sévère, dommages rénaux et hémorragie de la muqueuse). Concernant la LV épidémique, elle est souvent anthroponotique (Figure 3) et touche les personnes de tous âges. Ces épidémies peuvent donner lieu à des formes aiguës de LV avec un taux de mortalité élevé. Entre 1984 et 1994, l'épidémie de LV qui a sévi dans le Sud du Soudan (Haut-Nil occidental), a atteint un taux de mortalité d'environ 36% de la population (Guerin et al., 2002; Seaman et al., 1996; WHO, 2010).

1.5. La leishmaniose dermique post-kala-azar

La leishmaniose dermique post-kala-azar (LDPKA) est une séquelle de la LV et se produit principalement en Afrique orientale (50% des patients) et sur le sous-continent indien (10% des patients). Elle est consécutive à une infection par *L. donovani* et peut apparaître entre 6 mois et plusieurs années après une guérison apparente. Elle se caractérise par l'apparition de macules érythémateuses (taches de couleur et de tailles variables) sur tout le corps qui peuvent devenir papuleuses ou nodulaires sur le visage (Figure 2D). Elle peut également affecter la muqueuse buccale, génitale et oculaire. Au Soudan, 84% des cas de LDPKA non sévère peuvent guérir spontanément, mais rarement, voire jamais, en Inde (WHO, 2010; Zijlstra et al., 2003).

2. L'hôte vecteur : le phlébotome

Les phlébotomes sont les seuls insectes hématophages dont la capacité à transmettre le parasite *Leishmania* a été démontrée expérimentalement. Certains autres arthropodes hématophages tels que les puces et les tiques ont été également suspectés d'être des vecteurs de la leishmaniose, mais les preuves expérimentales étant peu convaincantes, ils ne sont généralement pas pris en compte (Killick-Kendrick, 1999). À ce jour, on peut estimer qu'il existe plus de 800 espèces de phlébotomes à travers le monde, dont 464 espèces néo-tropicales regroupées en 23 genres, 20 sous-genres, trois groupes d'espèces et 28 séries. Parmi ces espèces, uniquement 98 ont été identifiées



Figure 4. Le phlébotome

Lutzomyia longipalpis lors d'un repas sanguin.

<http://www.plospathogens.org/article/info:doi/10.1371/image.ppat.v05.i08>.

Tableau I : Les sous-genres de *Leishmania* identifiés chez l'homme (WHO, 2010)

Sous-genre	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Viannia)</i>	<i>L. (Viannia)</i>
Ancien monde	<i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i>	<i>L. major</i> <i>L. tropica</i> <i>L. killicki</i> ^a <i>L. aethiopica</i> <i>L. infantum</i>	-	-
Nouveau monde	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. pifanoi</i> ^a <i>L. venezuelensis</i> <i>L. garnhami</i> ^a <i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. shawi</i> <i>L. naiffi</i> <i>L. lainsoni</i> <i>L. linbenbergi</i> <i>L. peruviana</i> <i>L. colombiensis</i> ^b	<i>L. braziliensis</i> <i>L. panamensis</i>
Principal tropisme	Viscérotropique	Dermotropique	Dermotropique	Mucotropique

^a Le statut des espèces est en cours de discussion, ^b La position taxonomique est en cours de discussion.

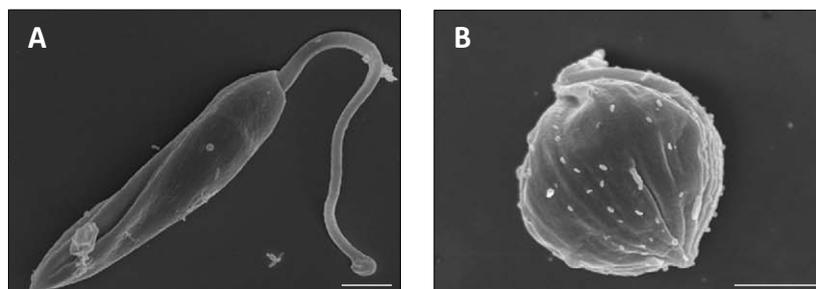


Figure 5. Visualisation en microscopie électronique à balayage de *Leishmania donovani*

Les cellules ont été fixées avec 2,5% de glutaraldéhyde puis visualisées par microscopie électronique à balayage. **(A)** Promastigote axénique : corps allongé avec un long flagelle. **(B)** Amastigote axénique : corps ovoïde et flagelle rétracté. La barre correspond à 1 µm.

("Cyclosporin A treatment of *Leishmania donovani* reveals stage-specific functions of Cyclophilins in parasite proliferation and viability", Yau et al., 2010).

comme capable de transmettre la leishmaniose : 42 espèces *Phlebotomus* dans l'Ancien Monde et 56 espèces *Lutzomyia* dans le Nouveau Monde (WHO, 2010).

Les phlébotomes sont de petite taille et dépassent rarement 3,5 mm de long, ce qui leur permet de passer aisément à travers les mailles des moustiquaires classiques. Leur couleur varie de presque blanc à presque noir et deux caractéristiques les rendent faciles à reconnaître : au repos, ils tiennent leurs ailes en forme caractéristique de « V » au-dessus de l'abdomen et ils sont recouvert de poils (figure 4). L'activité des phlébotomes est crépusculaire ou nocturne, bien que quelques espèces se nourrissent pendant la journée dans des lieux de repos diurnes frais et humides (maisons, écuries, grottes, végétation, terriers...). Des études préliminaires avec un tunnel de vent suggèrent que leur vitesse de vol maximale est un peu moins de 1 m/s. Leur distance de vol est généralement très courte (environ 300 m) et les obstacles très haut (environ 3 m) sont infranchissables (Killick-Kendrick, 1999).

Les phlébotomes mâles et femelles se nourrissent de sucres qu'ils trouvent dans la sève des plantes ou dans le miellat des pucerons. Ces sucres constituent leur principale source d'énergie et jouent un rôle important dans le développement des parasites dans leur intestin. Seules les phlébotomes femelles pratiquent le repas sanguin, par telmophagie (cisaillement du derme par les pièces buccales pour former un petit lac de sang avant aspiration) afin d'obtenir les protéines nécessaires au développement complet de leurs œufs (Maroli et al., 2013).

3. Le parasite : *Leishmania*

3.1. Taxonomie

Le genre *Leishmania*, nommé d'après le biologiste écossais WB Leishman, appartient à l'ordre des *Kinetoplastida* dans la famille des *Trypanosomatidae* et se divise en deux sous-genres : *Leishmania* et *Viannia*. Cette subdivision est basée sur le lieu de développement du parasite dans le tube digestif du phlébotome (intestin postérieur pour *Viannia*). On peut également noter, que le sous-genre *Leishmania* contient des espèces de l'Ancien et du Nouveau Monde, alors que le sous-genre *Viannia* ne contient que des espèces du Nouveau Monde (Tableau I). Toutefois, la taxonomie de *Leishmania* n'est toujours

pas définitive étant donné que le statut et la position taxonomique de certaines espèces sont toujours en discussion (WHO, 2010).

3.2. Caractéristiques morphologiques de *Leishmania*

Leishmania est un parasite hétéroxène, c'est-à-dire nécessitant plus d'un hôte pour compléter son cycle de vie, qui est capable de modifier sa forme afin de s'adapter aux changements environnementaux. La forme promastigote, présente chez le phlébotome, est mobile, extracellulaire et possède un corps allongé mesurant 15 à 30 µm de long pour 5 µm de large. Le noyau se trouve au centre du parasite, suivi en position antérieure, par le kinétoplaste et la poche flagellaire à l'intérieur de laquelle part un flagelle pouvant mesurer jusqu'à 20 µm (Figure 5A & 6). La forme amastigote, présente chez l'hôte mammifère, est intracellulaire et possède un corps cellulaire ovoïde d'environ 4 µm de long pour 2 µm de diamètre avec un flagelle réduit ne dépassant pas du corps cellulaire (Figure 5B & 6) (WHO, 2010).

Ces deux formes contiennent des organelles retrouvées chez la plupart des organismes eucaryotes (mitochondrie, lysosome, réticulum endo-plasmique), mais également des organelles qui leur sont propres : flagelle, poche flagellaire, kinétoplaste, acidocalcisomes et glycosomes (Figure 6) (Wheeler et al., 2013). Le flagelle est composé d'un axonème (série de neuf paires de microtubules organisées en cercle autour d'une paire centrale) et d'une tige paraflagellaire (ensemble complexe de filaments) impliquée dans la motilité flagellaire (Krüger and Engstler, 2015). La poche flagellaire est une invagination de la membrane plasmique d'où émerge le flagelle, mais est également le lieu principal d'endocytose et d'exocytose de la cellule. Le kinétoplaste se situe entre le noyau et la base du flagelle au sein de l'unique mitochondrie de *Leishmania*, et contient entre 5 et 20% de l'ADN total. Il se compose d'un réseau d'ADN circulaire comprenant quelques dizaines de copies de maxi-cercle (codant pour des protéines mitochondriales) et plusieurs milliers de copies de mini-cercle (codant pour les ARN guide servant à décoder les maxi-cercles). Les acidocalcisomes sont des organelles globulaires (denses aux électrons) dont le contenu, acide, est riche en calcium et polyphosphates. Ils sont impliqués dans la régulation osmotique du parasite. Les glycosomes pourraient avoir évolué à

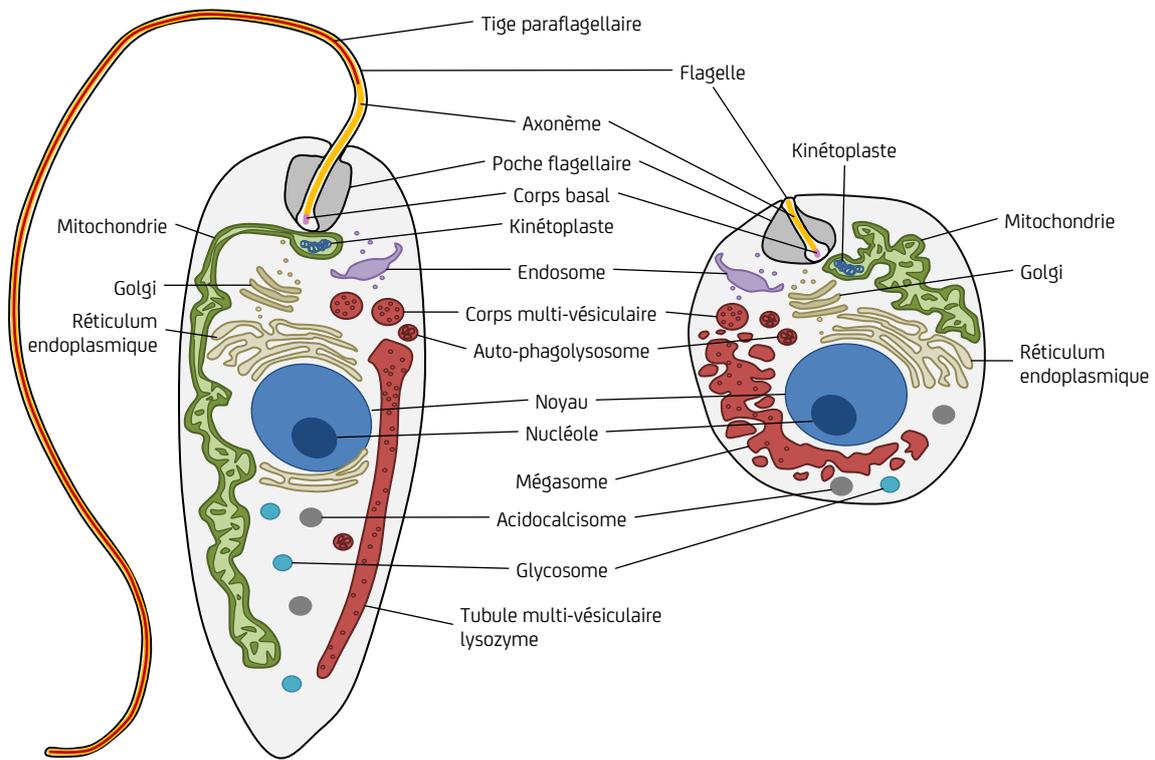


Figure 6. Représentation schématique des deux stades principaux de *Leishmania*

Représentation schématique des principaux organites intracellulaires des formes promastigote (à gauche) et amastigote (à droite) de *Leishmania*.

(Figure adaptée de "Protein turnover and differentiation in *Leishmania*", Besteiro et al., 2007).

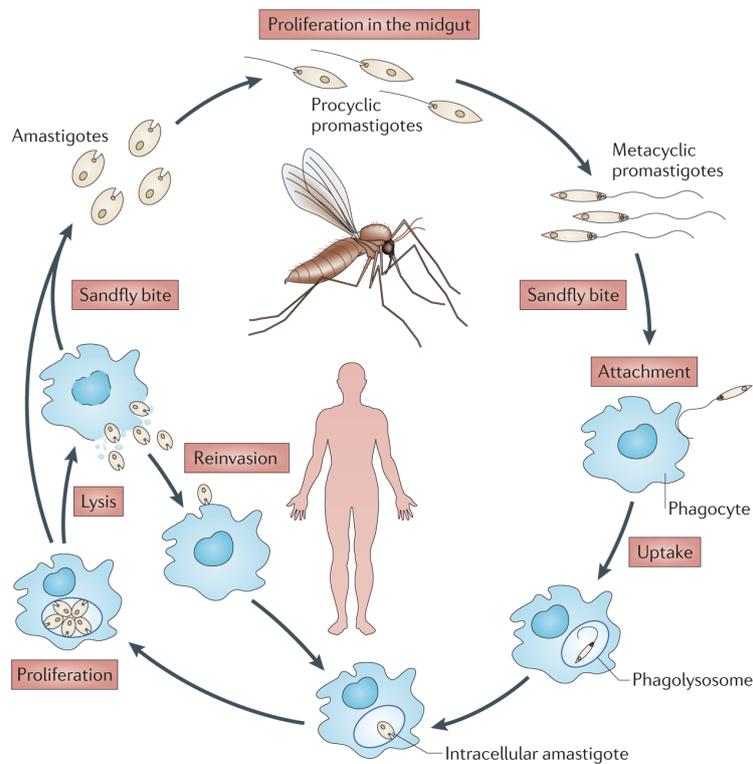


Figure 7. Cycle de vie de *Leishmania*

Le parasite *Leishmania* possède un cycle de vie hétéroxène, car il nécessite deux hôtes pour se développer. Il existe sous deux formes : promastigote (stade extracellulaire) chez le phlébotome et amastigote (stade intracellulaire) chez l'hôte mammifère.

("Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface", Kaye & Scott, 2011).

partir des peroxyosomes et contiennent la plupart des enzymes de la glycolyse. Ils sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires tels que la glycolyse, le stockage des purines, l'oxydation en bêta des acides gras et la synthèse des lipides éther. Le cloisonnement de la voie de la glycolyse dans ces organelles est important et unique aux trypanosomatidés (Docampo et al., 2005).

3.3. Cycle de vie

Leishmania possède un cycle de vie dimorphique constitué de deux stades : un stade extracellulaire sous forme de promastigote et un stade intracellulaire sous forme d'amastigote (Figure 7).

Forme Promastigote

Le développement de la forme promastigote dans le phlébotome se réalise en trois étapes :

1. Après le repas sanguin sur un hôte parasité, les macrophages présents dans le sang, et contenant les amastigotes, se retrouvent dans l'intestin moyen du phlébotome séparés de la paroi intestinale par la membrane péritrophique (sécrétée par les cellules épithéliales). Après protéolyse du bolus sanguin, les amastigotes libérés des macrophages se différencient en promastigotes procycliques (ovoïdes, peu mobiles) qui se multiplient de manière intense. Les promastigotes procycliques prennent alors une forme longue, mince et très mobile.
2. Après rupture de la membrane péritrophique, les promastigotes colonisent la paroi épithéliale de l'intestin moyen (*Leishmania*) ou du gros intestin (*Viannia*) du phlébotome en se fixant aux microvillosités des cellules épithéliales par l'intermédiaire de leur flagelle.
3. Après que le bolus sanguin ait été éliminé, les promastigotes migrent vers le haut de l'intestin pour s'accumuler massivement au niveau de la valve stomodéale du pharynx du phlébotome. Au cours de cette migration, les promastigotes vont se différencier en promastigotes métacycliques : forme courte et filiforme avec un flagelle très actif mesurant au moins deux fois la longueur du corps de la cellule (Sacks and Kamhawi, 2001).

Transmission à l'hôte mammifère

La transmission du parasite à un hôte mammifère a lieu lors du repas sanguin du phlébotome femelle par régurgitation des promastigotes métacycliques (10 à 1000) accumulés au niveau de la valve stomodéale. Cette régurgitation est principalement due à la présence d'un bouchon de gel, sécrété par

les promastigotes, qui obstrue la valve stomodéale et empêche le phlébotome de se nourrir correctement (Rogers et al., 2004). Au cours de la transmission du parasite, la salive du phlébotome joue également un rôle dans l'établissement de l'infection en limitant les processus oxydatifs et la présentation antigénique, mais également en influençant la réponse immunitaire (Kamhawi, 2000).

Forme Amastigote

Après transmission à l'hôte mammifère, les promastigotes sont rapidement phagocytés par les polynucléaires neutrophiles et les macrophages. Chez les macrophages, les promastigotes sont internalisés dans un phagosome (température entre 34 et 37°C) qui va ensuite fusionner avec des lysosomes pour devenir une vacuole parasitophore (VP) (Antoine et al., 1998). Au sein de la VP, le promastigote se retrouve dans un environnement acide (entre pH 4,5 et 5) qui, allié à la température, va induire la différenciation de celui-ci en amastigote. Aujourd'hui, les mécanismes moléculaires conduisant à la différenciation dans la VP sont encore mal connus, mais le développement de systèmes *in vitro* (ex : *L. donovani*) qui simulent les conditions de la VP (37°C & pH 5,5) ont permis d'améliorer les connaissances sur ces processus. En effet, la différenciation de promastigote en amastigote axénique est réalisée par un changement de pH du milieu de culture (de pH 7,4 à 5,5) et un changement de température d'incubation (de 26 à 37°C). Le processus de différenciation peut être divisé en quatre phases distinctes (Barak et al., 2005):

1. Perception du signal (0 à 5 h après l'initiation de la différenciation). Les parasites sont bloqués en phase G1 du cycle cellulaire, conduisant à leur synchronisation.
2. Arrêt des mouvements, régression du flagelle et agrégation (5 à 10 h).
3. Morphogenèse des amastigotes (10 à 24 h).
4. Maturation et prolifération (1 à 5 jrs).

Ce système a été utilisé à de nombreuses reprises avec succès pour de nombreuses études (Morales et al., 2007; Saxena et al., 2007; Tsigankov et al., 2012). Toutefois, il faut l'utiliser avec certaines réserves car il a été démontré que les amastigotes axéniques et les amastigotes spléniques (extraits de la rate d'un hamster développant une LV) sont différents en termes de morphologie et de virulence (Pescher et al., 2011).



Figure 8. Diagnostic et traitements de la leishmaniose

(A) Diagnostic de la LDPKA organisé par Médecins sans frontières dans le district de Vaishali, Etat indien du Bihar.

(B) Test de diagnostic rapide rK39. **(C)** Injection intralésionnelle d'antimoine pentavalents pour une infection cutanée en Afghanistan.

(D) Quatre patients recevant un traitement d'amphotéricine B liposomale par perfusion intraveineuse.

(<http://www.msf.org/> ; "Advances in leishmaniasis", Murray et al., 2005).

II. Contrôle de la maladie

La transmission des parasites s'effectue dans un système biologique complexe impliquant l'hôte animal ou humain, le parasite et le phlébotome (Figure 3). Par conséquent, le contrôle de la maladie est peu susceptible d'être atteint en agissant sur un seul des acteurs de la maladie. Pour cela, de nombreuses stratégies ont été mise en place.

1. Diagnostic, détection, prévention, contrôle et vaccination

Le diagnostic de la leishmaniose est réalisé par un médecin et consiste dans un premier temps en un examen des aspects cliniques de la maladie (Figure 8A) (WHO, 2010).

La détection du parasite permet la confirmation du diagnostic et peut être réalisée par une visualisation microscopique de la forme amastigote dans des frottis de lésions cutanées, ou dans des biopsies pour les cas de LV. Mais aussi, par une détection des parasites dans le sang du patient par culture *in vitro* et PCR, ou par des tests sérologiques en laboratoire (cas de LV) basés sur des techniques d'immunofluorescence indirecte, de dosage immuno-enzymatique (ELISA) ou de Western blot. Finalement, des tests sérologiques sur le terrain existent aussi, et sont basés sur le test d'agglutination directe (DAT) et l'immuno-chromatographie de rK39 sur bandelette (Figure 8B) (Chappuis et al., 2007).

La prévention est réalisée par la mise en place de mobilisation sociale, de sensibilisation sur les comportements à risque, mais aussi par des dépistages et des traitements précoces des cas pour réduire la transmission, les handicaps, les décès et surveiller la propagation (WHO, 2010).

Le contrôle des hôtes réservoirs et des phlébotomes est très souvent adapté à la situation locale pour atténuer ou diminuer la transmission des parasites (WHO, 2010).

La vaccination est une pratique peu efficace qui n'est pas ou plus utilisée aujourd'hui. Elle peut être réalisée par leishmanisation, pratique empirique très peu pratiquée qui consiste en l'inoculation intradermique d'exsudat d'une lésion active (causée par *L. major*) pour produire une lésion contrôlée dans une zone non visible du corps. Cependant, la procédure peut induire des lésions cutanées sévères chez les patients immuno-déficients. Il est également possible de réaliser des injections, soit de vaccins

candidats de première génération, réalisés à partir de parasites tués, ou de vaccins de deuxième génération, qui sont des vaccins à ADN ou des vaccins constitués de protéines recombinantes. Jusqu'à présent un seul vaccin de deuxième génération a atteint la phase des essais cliniques et il est peu probable qu'un vaccin soit disponible au cours des prochaines années (WHO, 2010).

2. Les médicaments leishmanicides

2.1. L'état actuel de la thérapie

Aujourd'hui, le traitement de la leishmaniose est problématique étant donné le nombre d'espèces différentes de *Leishmania* et les différents foyers d'infection à travers le monde. De plus, les médicaments permettant de traiter la leishmaniose sont peu nombreux, très toxiques et de moins en moins efficaces avec l'apparition de résistances. Les médicaments actuellement disponibles pour traiter la leishmaniose sont les suivants :

Les antimoiens pentavalents sont l'antimoniote de méglumine (Glucantime®) et le stibogluconate de sodium (Pentostam®). Leur mécanisme d'action est encore inconnu en dépit de leur utilisation depuis plus de 120 ans. Toutefois, leur mode d'action est comparé à celui de l'arsenic de par leur structure trivalente, et leur activité leishmanicide pourrait être due à une action sur le macrophage hôte. Ils peuvent être administrés par une injection intramusculaire, intralésionnelle (Figure 8C), ou par perfusion intraveineuse lente pour éviter tout risque de thrombose ultérieure. Les effets secondaires courants sont l'anorexie, les vomissements, les douleurs abdominales, les nausées, les malaises, les myalgies, les maux de tête et une léthargie. La cardio-toxicité et la mort subite sont des effets secondaires rares (Croft and Coombs, 2003; WHO, 2010).

L'amphotéricine B désoxycholate (Fungizone®) est un médicament antifongique qui interagit principalement avec l'ergostérol de la membrane plasmique en provoquant des pores qui modifient

Strength of link with climate change in Europe	High		<i>Vibrio</i> spp. (except <i>V. cholerae</i> O1 and O139)* Visceral leishmaniasis*	Lyme borreliosis*	Weighted high risk		
	Medium	CCHF Hepatitis A Leptospirosis	Tularaemia Yellow fever Yersiniosis	Campylobacteriosis Chikungunya fever* Cryptosporidiosis Giardiasis Hantavirus	Rift Valley fever Salmonellosis Shigellosis VTEC West Nile fever	Dengue fever TBE*	Weighted medium risk
	Low	Anthrax Botulism Listeriosis Malaria	Q fever Tetanus Toxoplasmosis	Cholera (O1 and O139) Legionellosis Meningococcal infection			Weighted low risk
		Low	Medium	High			
		Potential severity of consequence to society					

Figure 9. Analyse pondérée de l'impact du changement climatique sur les risques de maladies infectieuses en Europe

Les candidats proposés pour une surveillance spécifique de la maladie sont en police gras. (CCHF : « Crimean-Congo hemorrhagic fever » ; *Maladies à déclaration obligatoire dans certains états membres de l'UE, mais pas juridiquement déclarées à l'ECDC).

(“Monitoring EU emerging infectious disease risk due to climate change”, Lindgren et al., 2012).

l'équilibre ionique et conduisent à la mort cellulaire. Certaines études montrent également que l'amphotéricine B provoque un stress oxydatif dans les cellules fongiques, sans pour autant le corrélérer avec l'efficacité de la drogue. Elle est administrée par perfusion intraveineuse et les effets secondaires courants sont une thrombophlébite en réaction à la perfusion, la fièvre et la néphro-toxicité. L'hypokaliémie et la myocardite sont des effets secondaires graves rares (Croft and Coombs, 2003; WHO, 2010).

Les formulations lipidiques d'amphotéricine B sont constituées d'amphotéricine B incorporée dans des liposomes (Ambisome®) ou d'amphotéricine B en dispersion colloïdale. Elles sont similaires à l'amphotéricine B désoxycholate dans leur efficacité, mais sont nettement moins toxiques. Elles sont administrées par perfusion intraveineuse (Figure 8D). Les effets secondaires courants sont une réaction à la perfusion, légère fièvre et mal de dos. Une néphro-toxicité transitoire ou une thrombopénie peut également être observée (WHO, 2010).

L'iséthionate de pentamidine (Pentacarinat®) est un dérivé organique de synthèse dont le mode d'action n'est pas complètement élucidé, mais accumulé par le parasite, il interagirait avec l'ADN du kinétoplaste. Il est administré par voie intramusculaire ou, de préférence, par perfusion intraveineuse. Les effets secondaires graves comme le diabète, l'hypoglycémie sévère, la myocardite et la toxicité rénale limitent son utilisation (WHO, 2010).

La miltéfosine, originellement développée comme médicament anticancéreux, est aujourd'hui le premier médicament oral disponible (Impavido®) pour le traitement de la leishmaniose. Son mécanisme d'action n'est que partiellement connu et la plupart des études ont été réalisées sur des lignées cellulaires tumorales. Ces études suggèrent qu'elle agirait par inhibition de la protéine kinase C, de la phospholipase C, de la biosynthèse de la phosphatidylcholine et de l'homéostasie calcique. Les principaux effets indésirables observés sont des nausées et des vomissements (60% des patients) et sont beaucoup plus sévères chez les femmes et les jeunes enfants. Elle est aussi embryotoxique, foetotoxique, tératogène, et donc contre-indiquée pendant la grossesse. Une contraception est nécessaire durant le traitement et jusqu'à trois mois après la fin de celui-ci (Croft and Coombs, 2003; WHO, 2010).

2.2. Résistance des parasites

La résistance des parasites aux médicaments leishmanicides est aujourd'hui une réalité avec laquelle il faut compter. En effet, les antimoine, considérés comme le traitement de première ligne pour la majorité des leishmanioses depuis plus de 50 ans, voient leur utilisation limitée en raison d'un nombre croissant de cas de rechute liés à la résistance du parasite dans certaines régions endémiques, telles que l'Inde et le Népal. Actuellement, seule l'amphotéricine B est maintenue comme traitement de première ligne, et bien qu'aucune résistance à ce médicament n'ait été répertoriée, son administration par voie intraveineuse pendant plus de 4h, sa toxicité et son coût élevé font que son utilisation est limitée (Croft and Coombs, 2003).

Pour la Miltéfosine, aucun phénomène de résistance n'a été constaté et elle est actuellement envisagée pour le traitement de la leishmaniose canine afin de réduire le nombre de cas de leishmaniose humaine avec un cycle zoonotique domestique (Figure 3). Cependant, l'utilisation de la Miltéfosine, ou d'un médicament similaire, pour un traitement de masse de tous les chiens pourrait augmenter la probabilité de l'apparition de résistances (Croft and Coombs, 2003). En effet, des études *in vitro* récentes ont montré que les parasites pouvaient développer une résistance à la Miltéfosine par une mutation ponctuelle dans la séquence du gène codant pour le transporteur de la Miltéfosine. Cette mutation conduisant à une diminution de l'absorption du médicament devient plus fréquente lorsque la pression du médicament augmente, et persiste dans les cultures de parasites même en absence Miltéfosine (Laffitte et al., 2016).

Bien que de nouveaux médicaments soient apparus ces dernières années (Amphotéricine B et Miltéfosine), il semble maintenant clair que l'ambition des scientifiques de développer un médicament unique pour traiter toutes les formes de leishmaniose ait été trop optimiste, puisque les problèmes de traitement demeurent (Croft and Coombs, 2003). Il devient donc indispensable de développer de nouveaux médicaments leishmanicides pour soigner la maladie dans les zones endémiques, d'autant plus qu'elle fait partie des futures maladies émergentes en Europe (Figure 9) (Lindgren et al., 2012).

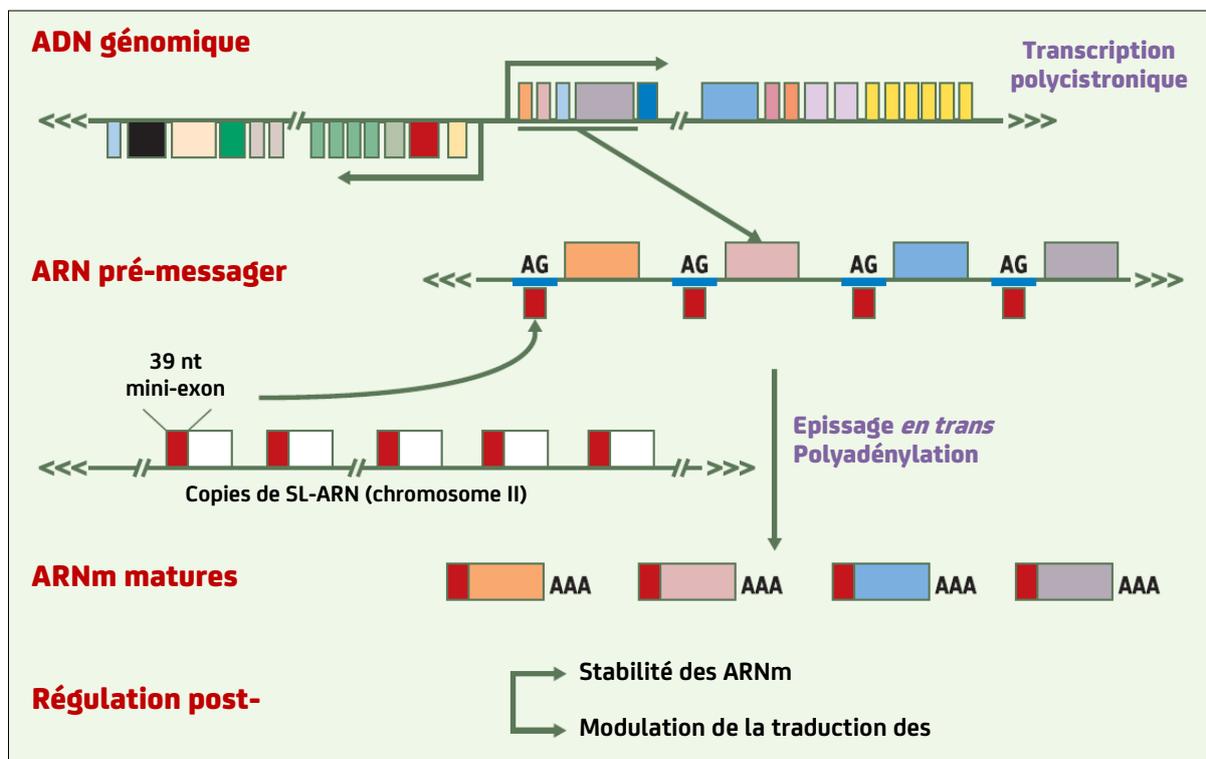


Figure 10. Organisation génique et maturation des messagers chez *Leishmania*

Les gènes de *Leishmania* sont organisés en unités polycistroniques. Ces unités sont co-transcrites en très grands pré-messagers qui sont maturés par l'addition d'un mini-exon en 5' (épissage *en trans*) et par polyadénylation en 3'. Les réactions d'épissage *en trans* et de polyadénylation sont couplées (SL-ARN : spliced leader ARN ; nt : nucléotide).

(“Le parasite *Leishmania* à l'ère de la post-génomique”, Ouelette et al., 2003).

III. Découverte de médicaments leishmanicides et déconvolution de cibles

1. Choix des cibles pour la découverte de médicaments leishmanicides

De l'initiation de la transcription à la régulation des protéines, le parasite *Leishmania* a développé des mécanismes spécifiques qui diffèrent grandement des autres eucaryotes. Afin d'identifier de potentielles cibles thérapeutiques, il faut dans un premier temps prendre en compte ces systèmes de régulation uniques.

1.1. Génome et transcription

La cartographie et le premier séquençage du génome de la souche la souche *Leishmania major* MHOM/IL/81/Friedlin a permis d'estimer sa taille à environ 32,8 Mb distribués sur 36 chromosomes (Britto et al., 1998; Ivens et al., 2005). Cependant, bien que la complexité du génome reste globalement conservée, il faut noter que certaines isolats de *L. major* n'ont que 34 ou 35 chromosomes (Britto et al., 1998). De plus, il a été estimé que le génome contenait un peu plus de 8000 gènes codants pour des protéines, dont plus de la moitié sont uniques à *Leishmania*, et plus de 60% n'ont pas de fonctions identifiées (Ivens et al., 2005). Toutefois, une étude comparative récente des transcriptomes de promastigotes, d'amastigotes axéniques et d'amastigotes intracellulaires, a permis d'identifier 936 nouveaux gènes et on peut donc estimer, aujourd'hui, que le génome de *Leishmania* serait potentiellement constitué de 9169 gènes codant des protéines (Fiebig et al., 2015).

Leishmania est un parasite qui a divergé tôt dans l'arbre phylogénétique des eucaryotes dont le mode de régulation de l'expression des gènes présente des propriétés inédites. Contrairement aux eucaryotes supérieurs, les gènes de *Leishmania* sont organisés dans de larges unités polycistroniques qui sont soit convergentes, soit divergentes. De plus, il ne semble pas exister de régulation de l'initiation de la transcription (aucun promoteur pour l'ARN polymérase II et très peu de facteurs de transcription) mais essentiellement une régulation post-transcriptionnelle. Au cours de la transcription, les ARN pré-messagers de l'unité polycistronique sont clivés simultanément par épissage *en trans* à l'extrémité 5' (ajout d'une séquence de 39 nucléotides appelée « splice leader ») et polyadénylation en 3' (ajout d'une queue polyadénylée) (Figure 10) (Ouellette et al., 2003). Actuellement, nous ne savons encore rien

sur les mécanismes de régulation de l'expression des gènes en réponse aux variations environnementales, mais les déclencheurs tels que le changement de température et le changement de pH au cours de la différenciation de promastigote en amastigote ont été bien définis. L'hypothèse qui semble, aujourd'hui, la plus plausible, est que la régulation de l'abondance des protéines, chez *Leishmania*, dépendrait essentiellement de régulations traductionnelles et/ou post-traductionnelles (Clayton, 2002; Saxena et al., 2007).

1.2. Différenciation et phosphorylation

L'idée que l'abondance d'un ARNm est un indicateur de l'abondance de la protéine correspondante est souvent fautive. Cela est particulièrement le cas pour *Leishmania* puisqu'il n'y a pas de régulation transcriptionnelle, mais seulement des régulations post-transcriptionnelles, traductionnelles et post-traductionnelles. Une analyse du protéome de *Leishmania* au cours de la différenciation des promastigotes en amastigotes axéniques a permis de révéler qu'un grand nombre de ces modifications post-traductionnelles (méthylation, acétylation, ubiquitination et phosphorylation) ont lieu durant cette période (Rosenzweig et al., 2007). De plus, il a également été démontré que la protéine eIF2 α (« eukaryote translation initiation factor 2 alpha »), facteur essentiel de la traduction chez les eucaryotes, était phosphorylée de manière beaucoup plus importante au cours de la deuxième phase de la différenciation. Etant donné que cette phosphorylation entraîne une diminution de la traduction des protéines chez les eucaryotes, ces observations pourraient impliquer la phosphorylation comme un élément régulateur du contrôle de la différenciation des parasites (Tsigankov et al., 2012).

Aujourd'hui, l'intégralité du phospho-protéome de *Leishmania* n'a pas encore été identifié, mais chez

Tableau II : Groupes et familles des ePKs dans les trypanosomatidés (Parsons et al., 2005).

Groupe	Famille	<i>T. brucei</i>	<i>T. cruzi</i>	<i>L. major</i>
AGC	(na)	6	7	6
	NDR	2	1	1
	PKA	3	3	3
	RSK	1	1	1
	Total	12	12	11
CAMK	(na)	7	7	9
	CAMKL	7	6	7
	Total	14	13	16
CK1	CK1	4	7	6
	TTBK	1	1	1
	Total	5	8	7
CMGC	(na)	1	1	1
	CDK	11	10	11
	CLK	4	5	4
	DYRK	7	7	8
	GSK	2	2	2
	CDKL (MAPK-like)	2	1	2
	MAPK	10	11	12
	RCK (MAPK-like)	3	3	3
	SRPK	2	2	2
	Total	42	42	45

Groupe	Famille	<i>T. brucei</i>	<i>T. cruzi</i>	<i>L. major</i>
Autre	AUR	3	3	3
	CAMKK	4	4	4
	CK2	2	2	2
	NAK	0	1	1
	NEK	20	22	22
	PEK	3	2	3
	PLK	2	2	1
	TLK	2	1	1
	ULK	1	1	1
	VPS	1	1	0
WEE	1	2	2	
Total		39	42	40
STE	(na)	7	8	10
	STE7	2	2	2
	STE11	14	18	21
	STE20	2	3	1
	Total	25	31	34
Unique		19	23	26
Total ePK		156	171	179
Non-catalitique		13	16	16

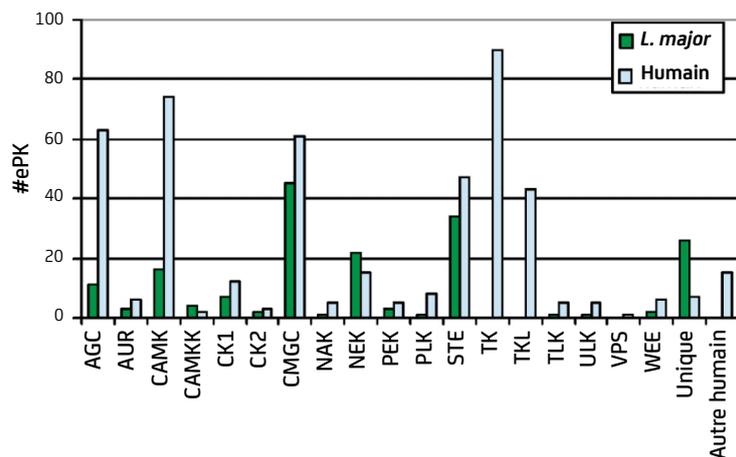


Figure 11. Comparaison des ePKs entre l'homme et *L. major*

Comparaison des grands groupes et des familles de protéines kinases humaines avec celles de *L. major*.

("Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic trypanosomatids: *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*", Parsons et al., 2005).

d'autres organismes modèles, telle que la levure, la phosphorylation des protéines affecte environ 30% du protéome et on peut supposer que la proportion est sensiblement la même chez *Leishmania*. De plus, chez la levure, la phosphorylation des protéines est un mécanisme majeur de régulation qui contrôle de nombreux processus cellulaires de base (Ptacek et al., 2005; Tsigankov et al., 2014). Donc, étant donné que la majorité des phosphoprotéines identifiées, à ce jour, ont été essentiellement identifiées au stade amastigote en relation avec la réponse au stress (Morales et al., 2010; Morales et al., 2008), cela soutient l'hypothèse que la phosphorylation des protéines joue un rôle essentiel lors de la différenciation de *Leishmania* (Tsigankov et al., 2014).

1.3. Les kinases

Chez les procaryotes et les eucaryotes, la phosphorylation des protéines est reconnue comme un mécanisme majeur et essentiel permettant de réguler de nombreux processus biologiques. Cette modification post-traductionnelle est réalisée par des kinases, qui permettent une modification rapide et réversible de l'état d'une protéine afin de l'activer ou de l'inactiver, mais aussi son association avec d'autres partenaires protéiques.

Les kinases sont des enzymes du groupe des transférases capables de transférer un groupement phosphate sur un substrat. Au cours de cette réaction, la kinase se lie à son substrat puis capture une molécule d'ATP au sein de sa poche de liaison à l'ATP. L'ATP est alors hydrolysé en ADP par transfert de façon covalente d'un groupement phosphate sur le groupe hydroxyle libre de la sérine, de la thréonine ou de la tyrosine du substrat. La plupart des kinases phosphorylent des sérines et/ou des thréonines, mais certaines uniquement la tyrosine. Il existe également des kinases, comme celles de la famille des DYRKs (Dual-specificity tyrosine-regulated kinases) qui peuvent phosphoryler ces trois acides aminés. En 2005, une analyse bio-informatique des génomes de *L. major*, *T. brucei* et *T. cruzi* réalisée pour rechercher les protéines kinases eucaryotes (ePKs) et les protéines kinases atypiques (aPKs) a révélé un nombre élevé de kinases. Cette analyse a permis d'identifier 176 protéines kinases pour *T. brucei*, 190 pour *T. cruzi* et 199 pour *L. major*, représentant ainsi, 30% du nombre de protéines kinases présentes chez l'homme et le double des protéines kinases du

parasite agent du paludisme, *Plasmodium falciparum* (Parsons et al., 2005). Les protéines kinases de ces trois trypanosomatidés ont été classées dans les sept principaux groupes ePKs (AGC, CAMK, CMGC, TK, TKL, STE, autre) sur la base de la similarité de séquence des domaines catalytiques (Tableau II). Ensuite, la comparaison du kinome de *L. major* avec celui de l'homme a révélé une absence totale de récepteurs à activité tyrosine kinase (TK et TKL) et peu de ePKs avec des domaines transmembranaires prédits chez *Leishmania* (Figure 11). De plus, certains groupes, tels que CAMK et AGC, sont faiblement représentés, alors que d'autres, comme CMGC et STE, sont très importants (~40% protéines kinases identifiées). L'abondance du groupe CMGC, comprenant les kinases cycline-dépendantes, les MAP kinases, GSK3, les kinases à double spécificité DYRK et CLK, pourrait suggérer que ces protéines kinases sont indispensables au parasite et qu'elles feraient des cibles de choix pour le développement d'inhibiteurs spécifiques. D'autre part, cette étude a également démontré l'impossibilité de classifier un grand nombre de ces ePKs, et semble indiquer que ces enzymes pourraient être différentes dans leur structure et/ou leur fonction par rapport aux ePKs des mammifères. Par conséquent, ces ePKs inclassifiables pourraient également constituer des cibles thérapeutiques potentielles (Naula et al., 2005; Parsons et al., 2005).

1.4. Les inhibiteurs de kinases

La famille des kinases étant une cible majeure pour la découverte de médicaments par l'industrie pharmaceutique, un grand nombre d'inhibiteurs sont actuellement en développement clinique ou ont été approuvés pour commercialisation par la Food and Drug Administration (FDA) pour traiter une grande variété de maladies. Les inhibiteurs de kinases ont été classés en quatre types différents en fonction de leur mécanisme d'action. Les inhibiteurs de type 1 constituent la majorité des inhibiteurs compétitifs de l'ATP et reconnaissent la conformation active des kinases (conformation favorable à l'hydrolyse de l'ATP). Ils sont généralement constitués d'un noyau hétérocyclique qui occupe le site de liaison purine. Les inhibiteurs de type 2 comme le Gleevec (traitement de la leucémie myéloïde chronique et des tumeurs stromales gastro-intestinales) reconnaissent la conformation inactive des kinases et les maintiennent dans cette conformation en bloquant

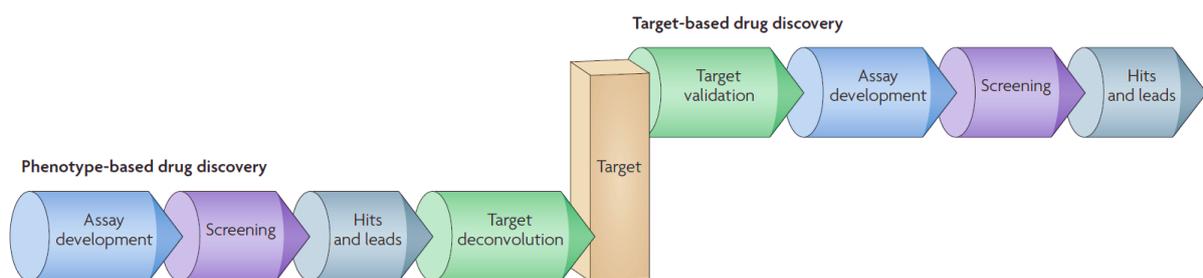


Figure 12. Les approches phénotypiques et ciblées pour la découverte de médicaments

Ce diagramme illustre les approches utilisées pour la découverte de médicaments, ainsi que toutes les étapes qui les constituent. Dans l'approche phénotypique (« Phenotype-based »), les molécules actives sont obtenues en premier, puis on utilise la déconvolution cible afin d'identifier les cibles moléculaires responsables des effets phénotypiques observés. Dans l'approche ciblée (« Target-based »), les cibles moléculaires sont identifiées et validées, puis on développe les dosages et les criblages nécessaires à l'identification de molécules actives.

(“Target deconvolution strategies in drug discovery”, Terstappen et al., 2007).

leur boucle d'activation. Les inhibiteurs allostériques se lient à l'extérieur de la poche de liaison de l'ATP (sur un site allostérique) pour bloquer l'activité des kinases. Et finalement, les inhibiteurs covalents qui forment une liaison covalente irréversible avec le site actif des kinases par réaction avec un résidu de cystéine nucléophile (Zhang et al., 2009).

Aujourd'hui, la plupart des inhibiteurs de kinase connus sont de type 1 ou 2. Les nouvelles technologies, les études sur la structure et la fonction des kinases ont conduit à l'évolution des connaissances sur les propriétés moléculaires des kinases et ainsi mis l'accent sur l'identification des inhibiteurs allostériques (Eglen and Reisine, 2011). De plus, ces connaissances sur les kinases humaines ont également une importance majeure pour la découverte de médicaments leishmanicides. En effet, elles permettent d'élucider la fonction des kinases homologues chez *Leishmania*, d'exploiter les

potentielles différences existantes entre les kinases des deux espèces pour le développement de médicaments, mais aussi, de générer des banques de plusieurs milliers de composés qui pourraient être utilisées pour des criblages sur les kinases du parasite (Naula et al., 2005).

Pour conclure, l'ensemble de ces éléments suggèrent que les kinases sont d'excellentes cibles thérapeutiques sur lesquelles nous pouvons utiliser les inhibiteurs de kinases expérimentaux des nombreuses banques de composés initialement développées pour d'autres maladies telles qu'Alzheimer, le Cancer ou les maladies cardiovasculaires.

2. Approches de criblage et méthodes de déconvolution de cibles

Ces dernières années, l'approche phénotypique a connu une renaissance avec la possibilité de cribler à haut débit des milliers de composés afin d'identifier de nouveaux médicaments (Terstappen et al., 2007). Le processus consistant à identifier *a posteriori* les cibles moléculaires des composés actifs est appelé déconvolution de cible. Il s'agit d'une étape essentielle dans la compréhension des mécanismes d'actions des composés identifiés par l'approche phénotypique. Les progrès récents dans les technologies « omiques », couplées avec des approches *in silico* et le coût réduit du séquençage de génome entier, ont grandement facilité le travail de déconvolution de cible et contribué à l'augmentation de l'intérêt pour l'approche phénotypique. De plus, la déconvolution de cible ne se limite pas à l'identification des cibles de composés identifiés par l'approche phénotypique, mais joue également un rôle majeur dans la validation de la spécificité d'un composé pour sa cible dans l'approche ciblée. En effet, la limitation majeure de cette approche est essentiellement due à l'effet hors cible de nombreux composés qui interagissent avec plusieurs cibles (estimé à six en moyenne). La déconvolution est alors indispensable pour identifier ces cibles et ainsi permettre d'optimiser la structure des composés pour plus de spécificité (Lee and Bogoy, 2013).

2.1. L'approche de criblage ciblée et l'approche phénotypique dans la recherche de nouveaux médicaments

Les stratégies de découverte de médicaments actuellement utilisées comprennent à la fois des approches ciblées et phénotypiques (Figure 12). L'approche ciblée est principalement fondée sur des hypothèses et, comme l'indique son nom, focalisée sur une cible unique. Elle utilise la biologie moléculaire, la biochimie, la chimie et l'informatique pour conduire à la découverte de nouveaux médicaments, mais aussi pour en mesurer l'efficacité et la toxicité. L'approche phénotypique repose sur

l'évaluation de l'effet de produits chimiques sur un phénotype donné (caractéristiques observables d'un organisme) dans des systèmes biologiques, tels que les animaux ou les cellules. Au début du XIXe siècle, la possibilité d'isoler pharmacologiquement les substances actives a été une étape clé vers la découverte des médicaments modernes et a conduit à la mise sur le marché de nombreux médicaments importants. Mais, dans les années 90, les progrès de la biologie moléculaire, de la biochimie et la possibilité de séquencer des génomes entiers, a orienté la recherche de nouveaux médicaments vers l'approche ciblée. Toutefois, cette approche qui a connu de très grands succès avec la découverte de

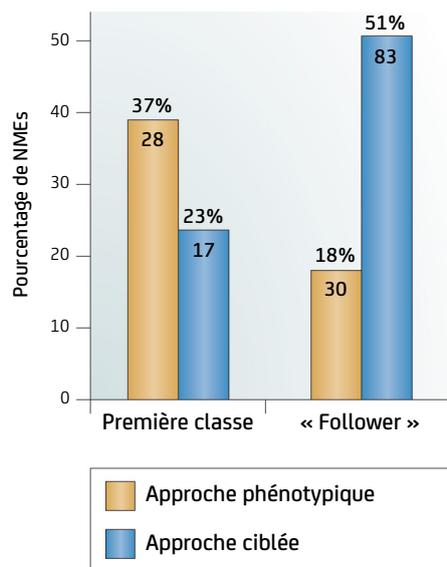


Figure 13. Répartition des nouveaux médicaments découverts entre 1999 et 2008

Le graphique illustre le nombre de nouvelles entités moléculaires (NME) découvertes pour les médicaments de première classe et les médicaments prototypes (« Follower drug »), selon l'approche de découverte utilisée.

(Figure adaptée de "Phenotypic vs. Target-Based Drug Discovery for First-in-Class Medicines", Swinney, 2013).

médicaments comme l'Imatinib (Gleevec) et le Gefitinib (Iressa), n'a pas permis la découverte d'autres médicaments majeurs (Terstappen et al., 2007). Aujourd'hui, il est difficile de déterminer si l'une ou l'autre de ces approches de criblages a plus de succès dans la découverte de nouveaux médicaments, mais une étude récente a répertorié la répartition des nouveaux médicaments découverts selon la stratégie utilisée entre 1999 et 2008 (Figure 13). Sur les 259 composés approuvés par la FDA, 75 étaient des médicaments de première classe (qui utilisent un mécanisme d'action nouveau et unique pour traiter une condition médicale) et 184 étaient des « Followers » (composés actifs, similaires à un médicament disponible, qui sont immédiatement développés à la suite). Pour les médicaments de première classe, l'approche phénotypique semble un peu plus efficace que l'approche ciblée avec respectivement 28 et 17 médicaments découverts. A l'inverse, l'approche ciblée semble beaucoup plus efficace que l'approche phénotypique pour la découverte de médicaments « Follower » avec 5 fois plus de composés découverts (respectivement 83 et 30). Cette étude indique que l'approche phénotypique est la plus prometteuse pour la découverte de médicaments de première classe à une époque où la majorité des efforts se sont concentrés sur l'approche ciblée (Swinney, 2013). Cependant, quelle que soit l'approche utilisée, ses avantages ou ses inconvénients, l'enjeu majeur qui en résulte est l'identification rétrospective des cibles moléculaires des composés sélectionnés.

2.2. Etat de la découverte de nouveaux médicaments leishmanicides

Chez *Leishmania*, il y a peu de cibles moléculaires validées, mais le Programme spécial « Research and Training in Tropical Diseases » (TDR), en accord avec l'OMS, a fourni une banque de cibles potentielles obtenues à partir des données biochimiques, génétiques et pharmacologiques de plusieurs agents pathogènes. Parmi ces cibles on retrouve la Trypanothion disulfure réductase (impliquée dans le maintien de l'équilibre redox du parasite), la Dihydrofolate réductase (nécessaire à la synthèse *de novo* des purines), la cystéine protéase B (facteur de virulence de la forme amastigote) et les ADN topoisomérases (dont les structures diffèrent radicalement de celles de l'hôte et qui sont impliquées dans la réplication de l'ADN, la

transcription et la recombinaison). La disponibilité des génomes complets de nombreuses espèces de *Leishmania*, a grandement favorisé l'approche ciblée et a permis l'évaluation de plusieurs cibles pharmacologiques sur lesquelles des approches génomiques, transcriptomiques, métaboliques, biochimiques et prédictives ont abouti à une meilleure compréhension de la biologie des parasites. Elles ont aussi permis une amélioration et une accélération du processus d'identification et de validation des cibles spécifiques du parasite.

Cependant, cette approche est généralement appliquée à des systèmes utilisant des cultures de promastigotes, forme retrouvée chez l'insecte, ou d'amastigotes axéniques (obtenus en l'absence de cellules hôtes) dont le profil d'expression des gènes est différent de celui des amastigotes (Introduction 1.3.3). De plus, cette approche ne prend pas en compte le fait que les amastigotes sont intracellulaires et localisés à l'intérieur de la VP du macrophage. Le médicament doit donc être capable de passer à travers plusieurs membranes, rester stable dans un environnement acide tout en conservant sa pleine efficacité. Finalement, à l'issue d'une approche ciblée, le composé sélectionné doit être validé par une approche phénotypique, et on estime que seul 4% de ces composés efficaces sur les cultures de promastigotes ont un effet sur les amastigotes intracellulaires. Par conséquent, bien que l'approche ciblée ait fait ses preuves, l'approche phénotypique reste au final la clé de voûte dans la phase de découverte de médicaments pour accéder aux essais précliniques (Rajasekaran and Chen, 2015; Reguera et al., 2014).

Les criblages phénotypiques sur *Leishmania* peuvent être classés selon le stade du parasite utilisé dans le criblage : promastigotes, amastigotes axéniques, ou amastigotes intracellulaires. Dans un premier temps, les criblages à haut débit (~200.000 composés) utilisant des promastigotes de *L. major* ont permis d'identifier 15 nouveaux composés, dont 13 qui inhibent la croissance des amastigotes axéniques. Toutefois, ces criblages ont été réalisés sur des promastigotes et des amastigotes axéniques qui ne sont pas physiologiquement pertinents comparés aux amastigotes intracellulaires. Par la suite, l'Institut génomique de la Fondation Novartis a réalisé le criblage de 2,2 millions de composés sur des amastigotes axéniques, mais lors de la confirmation sur des amastigotes intracellulaires, seul un faible

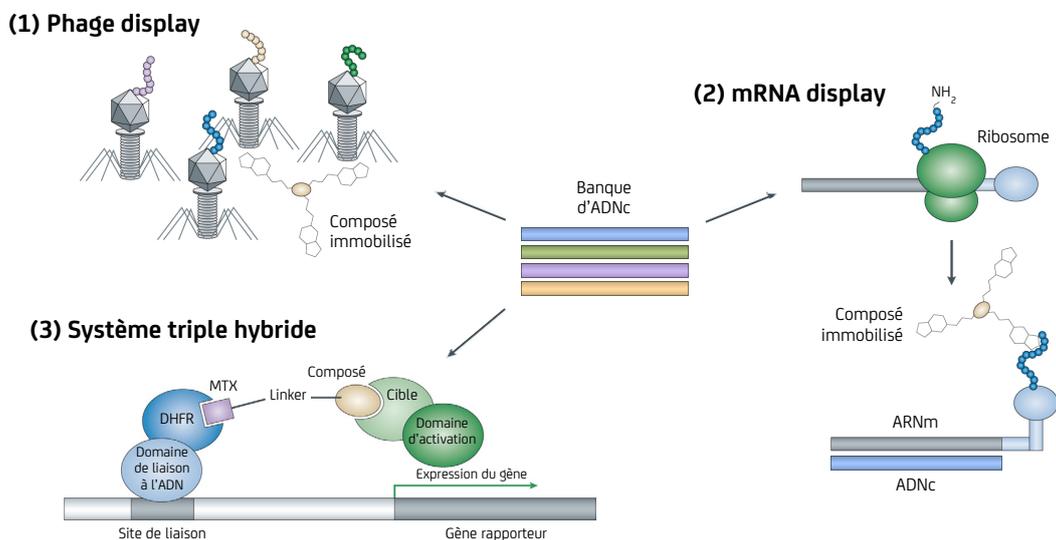


Figure 14. Les méthodes génétiques pour la déconvolution de cibles

Les méthodes génétiques utilisent une banque d'ADNc insérés dans des vecteurs d'expression pour générer une banque de protéines. **(a) « Phage display »** : Des bactériophages présentant les potentielles protéines cibles à leur surface sont purifiés via un composé immobilisé. La population capturée est amplifiée et soumise à d'autres cycles de purification jusqu'à obtention d'une population monoclonal qui peut être analysée pour l'identification des cibles du composé. **(b) « mRNA display »** : Une banque protéine/ARNm fusionnés créée *in vitro* est exposée à un composé immobilisé. Après purification par affinité et transcription reverse, l'ADNc des protéines capturées peut être amplifié par PCR pour identifier la cible. Plusieurs cycles de sélection peuvent être nécessaires. **(c) Système triple hybride** : Il utilise trois composants constitués d'un ligand (MTX) reliée à un composé, d'un domaine de liaison à l'ADN fusionné à un domaine de liaison au ligand (DHFR) et d'une banque de protéines fusionnées à un domaine d'activation de la transcription. La liaison du composé sur sa protéine cible active alors l'expression d'un gène rapporteur. DHFR : Dihydrofolate reductase ; MTX : Methotrexate.

(Figure adaptée de "Target deconvolution strategies in drug discovery", Terstappen et al., 2007).

taux des composés positifs a pu être confirmé. Toutefois, malgré ce faible taux de composés confirmés, l'ampleur de ce criblage a abouti à l'identification d'un nombre important de nouveaux composés. Pour conclure, l'ensemble de ces résultats indiquent que les amastigotes axéniques ne sont finalement pas l'organisme idéal pour la découverte de nouveaux médicaments (No, 2016).

2.3. Méthodes de déconvolution de cibles

L'identification des cibles des composés, appelée déconvolution de cibles, est indispensable pour la compréhension des mécanismes biologiques de la maladie. Elle est également essentielle à la conception de médicaments utilisant l'étude de la relation structure-activité (SAR) pour adapter la structure des composés chimiques à leur cible. Pour cela, un large éventail de méthodes peut être utilisé pour identifier les cibles moléculaires responsables des effets provoqués par les composés. Certaines utilisent la génétique, d'autres la biochimie, et toutes exploitent l'affinité du composé pour sa protéine cible. Toutefois, la plupart de ces méthodes n'ayant pas été initialement développées pour la déconvolution de cibles, il est important de comprendre leur principe de base, leurs avantages et leurs inconvénients avant de définir une stratégie expérimentale (Terstappen et al., 2007).

2.3.1. Les méthodes génétiques

Les méthodes génétiques utilisées en déconvolution sont le « phage display », le « mRNA display » et le système triple hybride (Figure 14). Elles utilisent toutes une banque d'ADNc insérés dans des vecteurs d'expression (pour générer une banque de protéines), une purification par affinité et un composé test immobilisé ou marqué. Elles permettent l'identification de toutes les cibles présentes dans le protéome (sans enrichissement fonctionnel), dont les cibles qui sont faiblement abondantes et/ou qui ont une faible affinité pour le composé test (Terstappen et al., 2007).

Le « Phage display » est une technique de sélection par affinité initialement développée pour identifier les interactions antigène-anticorps et les interactions protéine-protéine. Une banque d'ADN est fusionnée à un gène codant pour une protéine de l'enveloppe du bactériophage afin de générer une banque bactériophages-protéines (Figure 14a). Cette banque, où chaque bactériophage possède une protéine

unique à sa surface, est mise en contact avec le composé immobilisé et les cibles sont purifiées par affinité. Les bactériophages-protéines isolés peuvent être soumis à une étape de purification par affinité supplémentaire pour affiner la sélection (Terstappen et al., 2007).

Le « mRNA display » est une alternative de la méthode précédente et a été introduite comme une méthode dans laquelle les protéines sont exprimées fusionnées avec leurs ARNm correspondants (Figure 14b). Cela permet le criblage d'affinité direct et l'identification rapide de la protéine cible après une transcription inverse de l'ARNm et le séquençage de l'étiquette d'ADNc correspondante. Toutefois, à ce jour, aucune publication utilisant cette méthode de déconvolution n'a été publiée depuis l'article original en 2002 (Terstappen et al., 2007).

Le système triple hybride est une adaptation du système double hybride communément utilisé pour l'identification des interactions protéine-protéine. Il utilise les mêmes éléments, mais comprend une dimérisation chimique des deux hybrides via le composé test lié de manière covalente à un ligand (Figure 14c). Toutefois, depuis son développement dans les années 90, cette méthode n'a été que très faiblement utilisée (Terstappen et al., 2007).

2.3.2. Les méthodes *in silico*

Aujourd'hui, la conception de nouveaux médicaments assistée par ordinateur, basée sur des études de modélisation 3D et des criblages virtuels est devenue le nouveau fer de lance de la découverte de médicaments par l'approche ciblée. Avec la recrudescence de l'utilisation de criblages phénotypiques, ces méthodes *in silico* ont trouvé un nouveau rôle important dans le processus de prédiction de cibles. Depuis le début des années 2000, de nombreuses informations concernant les activités, les structures et les cibles potentielles de composés présents dans les chimiothèques ont été déposées dans des bases de données publiques telles que ChEMBL, DrugBank et ChemBank. Grâce à ces outils, les cibles des composés actifs peuvent être prédites sur la base de similitudes entre la structure des cibles et du composé. Cette prédiction de cibles assistée par ordinateur a été largement utilisée, et avec succès ces dernières années (Lee and Bogoy, 2013).

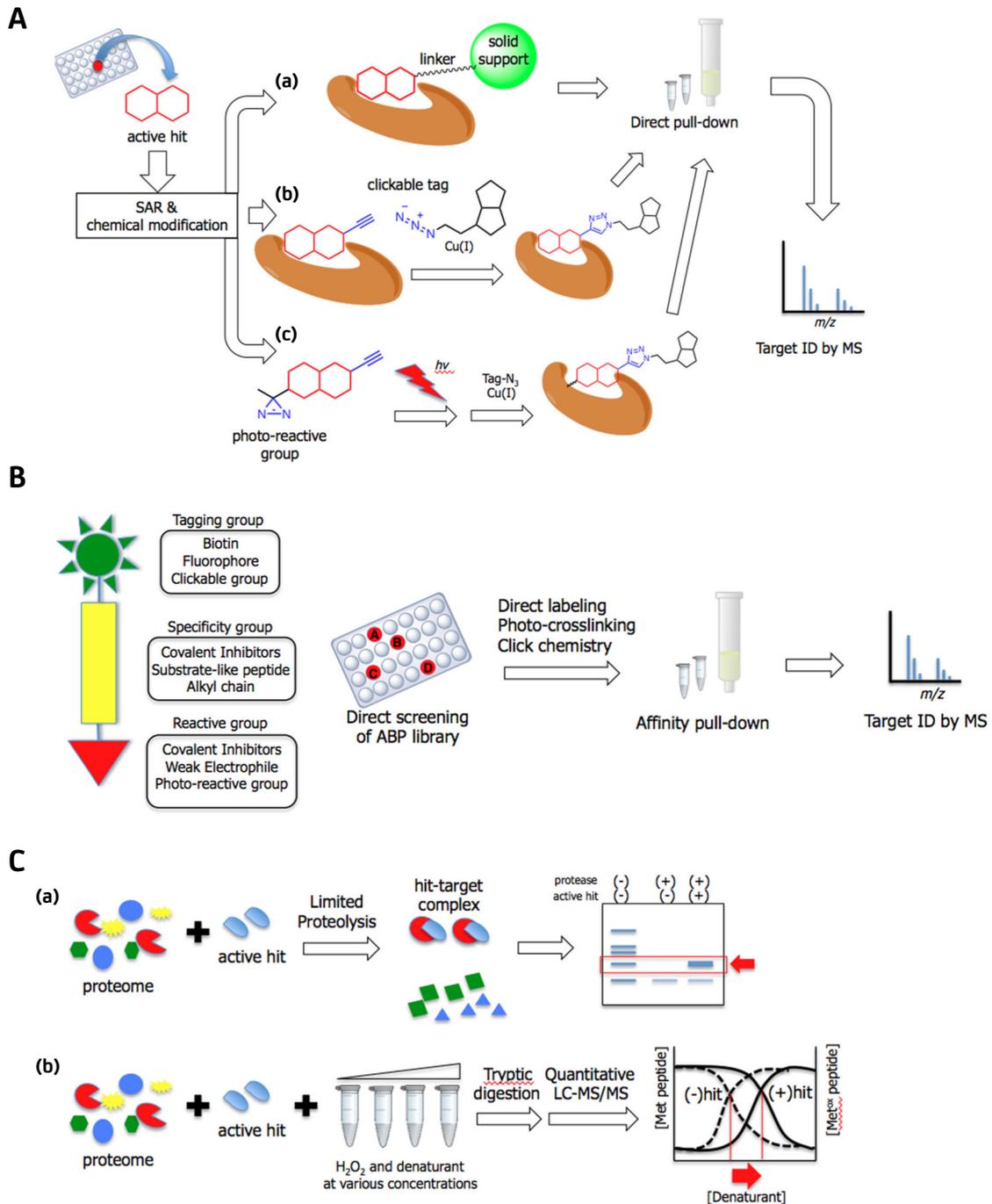


Figure 15. Les méthodes biochimiques pour la déconvolution de cibles

(A) Méthodes basées sur l'affinité : (a) Un composé est directement lié à un support solide ou à une étiquette afin d'isolé sa protéine cible par purification d'affinité. Puis, la protéine isolée est ensuite identifiée par spectrométrie de masse (MS) ; (b) Un composé avec un groupement alkyne interagit avec sa cible, et une étiquette avec un groupement azide (qui se lie au groupement alkyne du composé) permet de purifier la cible par affinité pour une identification MS ; (c) Procédure identique à (b) sauf que le composé possède également un groupe photo-réactif, qui en présence d'UV, forme une réticulation covalente entre le composé et la cible. **(B) Méthode basée sur l'activité :** Représentation des 3 groupes d'un ABP avec les différentes combinaisons possibles et méthode de purification par affinité des cibles des ABPs pour identification MS. **(C) Méthodes « Label-free » :** (a) Le composé interagit avec sa cible pour former un complexe protéine-composé qui sera plus résistant à la protéolyse en présence de dénaturant (« pulse-proteolysis ») ou sans dénaturant (DARTS). Les protéines résistantes à la protéolyse peuvent être analysées par SDS-PAGE et identifiées par MS ; (b) Le SPROX utilise un principe similaire à (a), mais en conditions oxydatives avec différentes concentrations d'un dénaturant. Les complexes protéine-composé les plus résistants à l'oxydant nécessitent une quantité plus élevée de dénaturant pour produire le même degré d'oxydation par rapport aux protéines libres. Les résultats peuvent être tracés et les interactions protéine-composé se traduisent par un décalage vers la droite des courbes.

(Figure adaptée de "Target deconvolution techniques in modern phenotypic profiling", Lee & Bogoy, 2013).

2.3.3. Les méthodes biochimiques

Il existe plusieurs méthodes qui peuvent être utilisées en combinaison avec les outils de protéomique. Elles utilisent l'affinité ou l'activité du composé test afin d'isoler ses cibles (Figure 15).

La méthode basée sur l'affinité est la plus largement utilisée pour isoler les protéines cibles d'un composé à partir d'un protéome complexe. Les composés tests sont chimiquement immobilisés sur un support solide qui est ensuite utilisé pour isoler les protéines cibles liées au composé. Cette méthode repose sur de nombreuses étapes de lavage pour éliminer les protéines qui ne se seront pas liées, suivies par des méthodes spécifiques pour éluer les protéines d'intérêts (Figure 15A-a). Les protéines éluées peuvent ensuite être identifiées en utilisant directement la spectrométrie de masse couplée à l'HPLC (LC-MS/MS), ou séparées par électrophorèse et identifiées par spectrométrie de masse (MS). Le problème majeur de cette méthode est la difficulté d'immobiliser le composé sur un support solide, car cette immobilisation peut affecter son affinité pour la cible. De plus, le processus exige une connaissance substantielle de SAR et nécessite souvent des efforts de chimie importants pour identifier le meilleur site de fixation tout en gardant l'activité du composé. Afin de surmonter ces problèmes la méthode « Click chemistry » a été développée pour réduire au minimum les perturbations de structure ou d'activité du composé par l'ajout d'un azide (ou alkyne) sur celui-ci (Figure 15A-b). Ensuite, après interaction du composé avec sa cible, celle-ci est purifiée via une étiquette munie d'un alkyne (ou azide) qui se lie au composé. Il est également possible d'accroître l'interaction entre le composé et sa cible en utilisant un groupe photo-réactif, qui en présence d'UV, forme une réticulation covalente entre les deux partenaires (Figure 15A-c).

La méthode basée sur l'activité est similaire à la méthode basée sur l'affinité, mais utilise un « Activity-based probe » (ABP) qui cible uniquement une classe spécifique d'enzyme (kinases, protéases, hydrolases, phosphatases, histone désacétylases, glycosidases) (Figure 15B). Les ABPs sont des molécules trifonctionnelles composées :

- d'une fonction sélective, contenant l'inhibiteur contre une classe spécifique d'enzyme,
- d'une fonction réactive électrophile qui se lie de façon covalente au site catalytique actif de l'enzyme cible, ou photo-réactive qui crée une

liaison covalente avec la cible lors d'une irradiation aux UV. Cette fonction permet d'augmenter la sélectivité de l'ABP.

- d'une fonction sortante qui permet d'isoler ou d'identifier l'ABP et la cible.

Les ABPs ne sont pas seulement utilisés pour la déconvolution de cibles, mais sont aussi des outils puissants pour les criblages.

Les méthodes « Label-free » ont l'avantage de ne nécessiter aucune modification chimique du composé test, permettant ainsi de faciliter le processus d'identification des cibles (Figure 15C). Ces méthodes récentes, reposent sur les modifications de la stabilité thermodynamique du complexe protéine-composé couplé à la spectrométrie de masse quantitative. Les techniques de protéolyses limitées exploitent la plus grande stabilité et résistance du complexe protéine-composé à la protéolyse par rapport aux protéines non liées. Le « Pulse-proteolysis » est réalisé en présence de dénaturant, alors que le DARTS (« Drug Affinity Responsive Target Stability ») est réalisé sans dénaturant (Figure 15C-a). Le SPROX (Stability of Proteins from Rates of Oxidation) est une technique dont le principe est similaire, mais qui exploite l'interaction protéine-composé en conditions oxydatives avec différentes concentrations de dénaturant (Figure 15C-b). Le complexe protéine-composé étant plus résistant à l'oxydant, il nécessite une concentration plus élevée de dénaturant pour produire le même degré d'oxydation par rapport aux protéines non liées (Lee and Bogyo, 2013).

2.4. Etat de la déconvolution de cibles chez *Leishmania*

Chez *Leishmania*, la déconvolution de cible est essentiellement réalisée à partir de composés identifiés par des criblages ciblés dont les cibles sont principalement : la Tyrosine amino-transférase, la trypanothion synthétase, les kinases cycline-dépendantes, la glycérol-3-phosphate déshydrogénase ou les ADN topoisomérases. La déconvolution de cible a été réalisée essentiellement par des approches biochimique ou *in silico* pour identifier les cibles secondaires de ces composés (Rajasekaran and Chen, 2015).

Concernant les composés identifiés par des criblages phénotypiques, actuellement aucune méthode de déconvolution de cibles n'a été appliquée chez *Leishmania*. Toutefois, une étude récente, sur

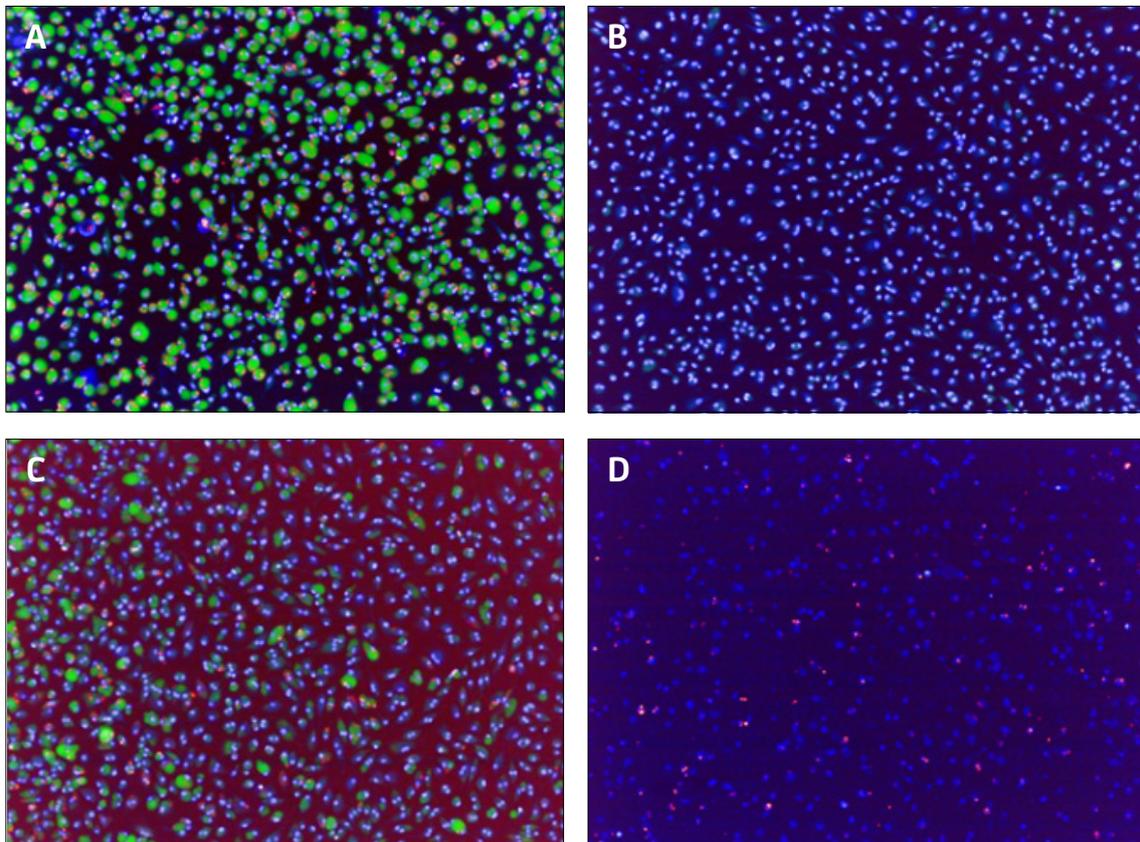


Figure 16. Criblage de composés par « High Content Analysis »

Superposition des images obtenues à 561 nm pour la détection des amastigotes DsRed2, à 488 nm pour le LysoTracker Green DND-26 qui émet une fluorescence en présence d'acidité (vacuoles parasitophores) et à 405 nm pour le Hoechst 33342 qui colore les noyaux des cellules vivantes. **(A)** Contrôle négatif (DMSO). **(B)** Composé actif ou contrôle positif (Amphotéricine B). **(C)** Composé faiblement actif. **(D)** Composé toxique ou contrôle positif toxicité (Cycloheximide).

(Données non publiées fournies par Eric Prina, unité de parasitologie moléculaire et signalisation, Institut Pasteur).

l'identification des cibles et des mécanismes de résistance des médicaments utilisés pour traiter la leishmaniose, a utilisé la méthode génétique appelée « Cosmid Sequencing » (Cos-Seq) et pourrait servir de base pour la déconvolution de cibles des composés issus de criblages phénotypiques. La méthode Cos-Seq est basée sur le clonage fonctionnel de l'intégralité du génome de *Leishmania* dans des cosmides qui sont surexprimés dans des parasites sous sélection pour un médicament donné. Puis, l'effet gain de fonction permettant au parasite de survivre est identifié par séquençage, permettant ainsi d'identifier les gènes « résistance » responsables de la survie du parasite au médicament. Pour les 5 médicaments leishmanicides testés dans cette étude, la méthode Cos-Seq a permis l'identification d'un nombre sans précédent de gènes de résistance, dont plusieurs gènes jamais identifiés. Bien que des études supplémentaires soient nécessaires pour déterminer si certains de ces gènes sont les véritables responsables de la résistance aux médicaments, cette méthode *in vitro* pourrait être appliquée dans des modèles animaux *in vivo* et fournir une avancée majeure dans la déconvolution de cibles chez *Leishmania* (Gazanion et al., 2016).

3. Projet de diplôme EPHE SVT

En 2008, le consortium LeishDrug (programme européen FP7) a été créé afin de développer une approche interdisciplinaire pour identifier le rôle des kinases associées à la virulence des amastigotes dans la leishmaniose.

Dans le cadre de ce programme, une méthode de criblage phénotypique innovante et biologiquement pertinente, appelée « High Content Analysis » (HCA), a été développée pour identifier de nouveaux composés leishmanicides. Contrairement aux tests de criblages actuels, le HCA mime les conditions réelles d'infection en utilisant des macrophages primaires de souris infectés par des amastigotes virulents d'une souche de *L. amazonensis* exprimant DsRed2 (Figure 16A). Lors du criblage HCA, l'effet leishmanicide d'un composé est visualisé par la disparition de la fluorescence rouge des parasites (DsRed2), et verte de la VP (Lysotracker green DND-26) qui est associée à la présence des parasites. Les composés actifs montrent une absence totale de fluorescence rouge et verte alors que les composés

2.5. Conclusion

Quelle que soit l'approche pour l'identification de nouveaux médicaments ou la méthode de déconvolution de cibles utilisée, l'objectif final est non seulement l'identification de cibles biologiques qui interagissent directement avec le composé, mais aussi la confirmation que l'inhibition de la cible identifiée est responsable du phénotype. Actuellement, en raison du manque de connaissances des mécanismes d'action de la plupart des maladies, le criblage et surtout la déconvolution de cibles reste une tâche ardue avec peu de chance d'aboutir à un médicament efficace. En effet, la déconvolution de cible nécessite beaucoup de temps et un investissement financier conséquent sans aucune certitude sur les résultats, et il est parfois nécessaire d'utiliser plusieurs méthodes. S'il est raisonnable de supposer que la découverte de médicaments et la déconvolution de cibles vont progresser dans l'avenir, il est actuellement impossible de prédire avec certitude quelle approche sera la plus efficace dans la découverte de nouveaux médicaments (Lee and Bogoy, 2013; Terstappen et al., 2007).

faiblement actifs montrent une diminution de l'un ou l'autre. La toxicité d'un composé est visualisée en parallèle par la disparition de la fluorescence bleue (Hoechst 33342), témoin de la dégradation des noyaux des macrophages (Figure 16) (Aulner et al., 2013). Cette approche évolutive qui pourrait être utilisée à haut débit, semble être, aujourd'hui, la meilleure option de criblage phénotypique chez *Leishmania*.

Dans le cadre de ce programme européen, puis du projet ANR TransLeish, nous avons utilisé cette méthode de criblage phénotypique en utilisant les banques de composés CNRS-Roscoff et PKRC (environ 2500 composés) qui ciblent préférentiellement les kinases. Ces criblages ont permis d'identifier 20 « hits » (composé non optimisé avec une activité leishmanicide) qui ont été ensuite reconfirmés par HCA. Parmi ces « hits », 3 familles de composés ont été identifiées : Paullones, Bis-Indolylmaléimides et Vibrindoles. Sur les conseils de nos collaborateurs chimistes,

nous avons finalement retenu la famille des Bis-Indolylmaléimides et des Vibrindoles pour une étude SAR. Pour la première famille, les études SAR sont en cours alors que pour la famille des Vibrindoles, 40 dérivés ont pu être générés à partir du composé ROSC004-A07. Ces dérivés ont été criblés par HCA pour finalement identifier 5 analogues avec une activité similaire au ROSC004-A07. N'ayant pas pu identifier de composé avec une meilleure activité, nous avons décidé d'utiliser le composé ROSC004-A07 pour la déconvolution de cibles (Prina et al., en préparation).

En parallèle, nous nous sommes également intéressés aux membres de la famille Caséine Kinase 1 (CK1) de *Leishmania*, qui ont été décrites comme étant des cibles thérapeutiques prometteuses, et plus particulièrement la Caséine Kinase 1 isoforme 2 (CK1.2) (LmjF.35.1010) (Allocco et al., 2006). En effet, cette kinase a été identifiée comme étant une exokinase capable de phosphoryler certaines protéines de la cellule hôte infectée, entraînant alors une action immunosuppressive (Silverman et al., 2008).

Dans le cadre du projet européen FP7 LeishDrug, nous avons utilisé une approche ciblée multidisciplinaire combinant des analyses bio-informatiques, biochimiques et pharmacologiques avec un test d'infection sur macrophages afin de caractériser et de définir si CK1.2 pouvait être considérée comme une cible thérapeutique. Cette approche a montré que la protéine recombinante et transgénique de CK1.2 pouvait phosphoryler des substrats spécifiques de CK1, et qu'elle était sensible à la température et aux inhibiteurs spécifiques de CK1 (Rachidi et al., 2014). Il a également été démontré que la réduction de l'activité de CK1.2 par D4476 (inhibiteur spécifique de CK1) bloque la croissance des promastigotes, compromet fortement la viabilité des amastigotes axéniques et diminue le nombre de parasites dans les macrophages infectés (Allocco et al., 2006; Rachidi et al., 2014). Donc, sans exclure totalement la possibilité de cibles secondaires du D4476, ces résultats soulignent le rôle potentiel de la CK1.2 dans la survie des parasites intracellulaires. De plus, des différences de structure et de profil d'inhibition entre CK1.2 de *Leishmania* et les kinases CK1 de mammifères ont été observées, et pourraient être exploitées pour le développement de

médicaments leishmanicides ciblant CK1.2 (Rachidi et al., 2014). Nous avons donc développé un criblage par test enzymatique qui a été utilisé sur environ 4000 composés ciblant les kinases. Soixante-quinze composés ont été identifiés avec une activité leishmanicide, mais après évaluation de la toxicité de ces composés sur des macrophages de souris et sur des lignées cellulaires humaines, seuls quatre composés ont pu être validés (PP2, 5'Iodotubercidin, NSC699479, Indirubin 42) (Durieu et al., 2016). Etant donné que le composé Indirubin 42 était le plus efficace et le moins toxique, nous avons réalisé une étude SAR qui a permis de générer 13 dérivés. Après criblage par test enzymatique et tests de toxicité, seul le composé Indirubin 1530 a été retenu et vient s'ajouter aux quatre composés validés comme candidats à une déconvolution de cibles.

Ces deux approches de criblage ont permis d'identifier une dizaine de nouveaux composés : Certains ont été sélectionnés pour leur efficacité contre le parasite (criblages phénotypiques), mais leurs cibles restent encore inconnues, et d'autres ont été sélectionnés pour leur efficacité à inhiber la Caséine kinase 1.2 (criblages ciblés), mais leur spécificité pour celle-ci n'a pas encore été établie (cibles secondaires possibles). Aujourd'hui, ces composés pourraient être optimisés pour le développement de nouveaux médicaments leishmanicides, et il est crucial de pouvoir identifier les cibles primaires et/ou secondaires de ces composés afin de comprendre leurs mécanismes d'action.

Pour cela, mon projet consiste à développer une nouvelle stratégie de déconvolution de cibles adaptée à ces inhibiteurs de kinases. Dans un premier temps, je devrais identifier et mettre au point une méthode qui me permette de capturer un nombre significatif de kinases, et qui pourraient être mise en concurrence par nos composés afin d'identifier leurs cibles. Dans un deuxième temps, je devrais également développer une approche, utilisant la protéomique, qui nous permettrait de déterminer la spécificité de nos composés. Et finalement, je devrais appliquer cette stratégie de déconvolution de cibles à nos composés afin de déterminer leur spécificité et leurs cibles.

Matériel & méthodes

I. Matériel

Tous les produits chimiques, de qualité analytique ou supérieure, ont été achetés chez Sigma-Aldrich, Life Technologie, VWR ou GE Healthcare Life Sciences. Les milieux de culture, de qualité certifiée pour la culture, i.e. stériles et testés pour les endotoxines, ont été achetés chez Gibco ou Sigma-Aldrich. Le pH des tampons a été mesuré à température ambiante.

1. Tampons, milieux et solutions commerciales

La composition ou les références fournisseurs de tous les tampons, milieux de cultures et solutions commerciales utilisés sont listées dans le tableau III ci-dessous.

Tableau III : Tampons, milieux et solutions commerciales

Extraction protéique	
Tampon de lyse TRITON	50 mM Tris-HCl pH 8 150 mM NaCl 1% TRITON X-100 Protease inhibitor cOmplete Mini EDTA-free
RIPA Buffer 1X (SA)	Sigma Aldrich (R0278)
RIPA Buffer 10X	Cell Signaling Technology (#9806)
Tampon de lyse RIPA 1X (CST)	10% RIPA Buffer 10X (Cell Signaling Technology) 1 mM PMSF Protease inhibitor cOmplete Mini EDTA-free
Tampon de lyse HEPES1	50 mM HEPES pH 8 150 mM NaCl 1 mM EDTA pH8 1% NP40 10% Glycerol Protease inhibitor cOmplete Mini EDTA-free
Tampon de lyse HEPES2	50 mM HEPES pH 8 150 mM NaCl 1 mM EDTA pH8 1% NP40 1% Deoxycholate de Sodium Protease inhibitor cOmplete Mini EDTA-free
Benzonase Nuclease >90% Purity	VWR (70746-4)
Electrophorèse SDS-PAGE	
NuPAGE LDS Sample Buffer 4X	Life Technologies (NP0007)
NuPAGE sample reducing agent 10X	Life Technologies (NP0004)
PageRuler prestained protein ladder	Thermo Scientific Pierce (11822124)
NuPAGE MES SDS Running buffer 20X	Life Technologies (NP0002)
Western blot	
Tampon de transfert 1X	25 mM Tris 192 mM Glycine 2,5% Ethanol
Superblock blocking buffer in TBS	Fisher Bioblock Scientific (10016723)
Tampon PBS-T	1X PBS 0,25% Tween 20
Tampon TBS-T	1X TBS 0,05% Tween 20
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific Pierce (34077)
Restore Western Blot Stripping Reagent	Fisher Bioblock Scientific (10057103)

Tableau III : Tampons, milieux et solutions commerciales (suite)

Coloration des protéines	
Solution de coloration Bleu de Coomassie	50% Méthanol 10% Acide acétique 0,05% Bleu brillant de Coomassie R250
Tampon de décoloration Bleu de Coomassie	10 % Ethanol 7 % Acide acétique
BioSafe Coomassie G250 Stain	Bio-Rad (161-0786)
Tampon de fixation SYPRO Ruby	50 % Méthanol 7 % Acide acétique
SYPRO Ruby protein gel stain	Life Technologies (S-12000)
Tampon de décoloration SYPRO Ruby	10 % Méthanol 7 % Acide acétique
Test d'activité kinase en gel (IGKA)	
Tampon de lyse IGKA	50 mM HEPES pH 8 150 mM NaCl 1 mM EDTA 100 µM Fluoride de Sodium 10 mM Pyrophosphate de Sodium 5 mM β-Glycerophosphate disodium 1% TRITON X-100 10% Glycerol 10 µg/ml Aprotinin 1 µM Leupeptin 1 µM Pepstatin 1 mM PMSF
Tampon d'élimination du SDS	50 mM Tris-HCl pH 8 20% Isopropanol
Tampon d'équilibration IGKA	50 mM Tris-HCl pH 8 1mM DTT
Tampon de dénaturation IGKA	50 mM Tris-HCl pH 8 20 mM DTT 1 mM EDTA 6 M Hydrochloride de guanidine
Tampon de renaturation IGKA	50mM Tris-HCl pH 8 5 mM DTT 1 mM EDTA 0,04% Tween-20
Tampon de renaturation IGKA	40 mM HEPES pH 7,4 20 mM β-Glycérophosphate disodique 10 mM MnCl ₂ 0,04% Tween-20 1 mM DTT 100 µM Orthovanadate de Sodium
Tampon de lavage IGKA	5% Acide Trichloroacétique 1% Pyrophosphate de Sodium décahydrate

Tableau III : Tampons, milieux et solutions commerciales (suite)

Tampon de réaction IGKA	40 mM HEPES pH 7,4 20 mM β -Glycérophosphate disodique 10 mM $MnCl_2$ 0,04% Tween-20 1 mM DTT 100 μ M Orthovanadate de Sodium
Staurosporine Capture Compound	
Stauro caprokit™ 50 reactions	1-1020-050 (Caprotec Bioanalytics GmbH)
Test d'activité kinase <i>in vitro</i> (IVKA)	
Tampon IVKA 10X	500 mM MOPS pH 7,5 1 M NaCl
γ -32P-ATP à 10 mCi/ml	Perkinelmer (NEG502A001MC)
Chromatographie d'affinité à l'ATP	
ATP Affinity Test Kit	Jena Bioscience (AK-102)
ATP AffiPur Kit I, S Kit	Jena Bioscience (AK-103S)
ATP AffiPur Kit II, S Kit	Jena Bioscience (AK-104S)
ATP AffiPur Kit III, S Kit	Jena Bioscience (AK-105S)
ATP AffiPur Kit IV, S Kit	Jena Bioscience (AK-106S)
Tampon de dialyse	1X PBS 1 mM EDTA 1mM DTT
Tampon de lavage 1X	1X Wash Buffer 1 mM DTT 1 mM Orthovanadate de Sodium 1X Protease Inhibitor Mix
Tampon d'éluion 1X	1X Elution Buffer 1 mM DTT 1 mM Orthovanadate de Sodium 1X Protease Inhibitor Mix
2-D DiGE	
ReadyPrep™ 2-D Cleanup Kit	Bio-Rad (163-2130)
Tampon d'échantillon compatible 2-D	30 mM Tris 7 M Urée 2 M Thiourée 4% CHAPS pH 8,5
Refraction-2D™ Labelling Kit	DyeAGNOSTICS (PR08)
3Dye Cy2/3/5 fluor Labeling Pack	Interchim (EV0871)
Immobiline DryStrip Cover Fluid	GE Healthcare Life Sciences (17-1335-01)
IPG Buffer pH 4-7	GE Healthcare Life Sciences (17-6000-86)
IPG Buffer pH 6-11	GE Healthcare Life Sciences (17-6000-78)
IPG Buffer pH 3-10	GE Healthcare Life Sciences (17-6000-87)

Tableau III : Tampons, milieux et solutions commerciales (suite)

Immobiline DryStrip pH 4-7, 18 cm	GE Healthcare Life Sciences (17-1233-01)
Immobiline DryStrip pH 6-11, 18 cm	GE Healthcare Life Sciences (17-6001-97)
Immobiline DryStrip pH 3-10 L, 18 cm	GE Healthcare Life Sciences (17-1234-01)
DeStreak Rehydration Solution	GE Healthcare Life Sciences (17-6003-19)
Tampon d'équilibration DTT	50 mM Tris-HCl pH 8,8 6 M Urée 30% Glycérol 2% SDS Bleu de Bromophénol 10 mg/ml de DTT
Tampon d'équilibration IAA	50 mM Tris-HCl pH 8,8 6 M Urée 30% Glycérol 2% SDS Bleu de Bromophénol 25 mg/ml de Iodoacétamide
Solution d'étanchéité	25 mM Tris 192 mM Glycine 0,1% SDS 0,5% Agarose Bleu de Bromophénol
2DHPE™ Large Gel NF 12.5 % Kit	SERVA Electrophoresis GmbH (43304.01)
2DHPE™ Large Gel NF 10 - 15 % Kit	SERVA Electrophoresis GmbH (43305.01)
Culture cellulaire	
Milieu de culture LD1S promastigote pH 7,4	Milieu M199 10 % SVF 20 mM HEPES pH 6,9 100 µM Adénine 100 U/mL Pénicilline/Streptomycine 2 mM L-glutamine 10 µg/mL Acide folique Vitamines 1X RPMI 1640 30 µM Hémine 8 µM 6-bioptérin 4,2 mM NaHCO ₃ 7,5 % pH ajusté à 7,4 avec NaOH
Milieu de culture LD1S amastigote axénique	Milieu RPMI 1640 20 % SVF 28 mM MES 2 mM L-glutamine Vitamines 1X RPMI 1640 10 µg/mL Acide folique 100 µM Adénine 100 U/mL Pénicilline/Streptomycine pH ajusté à 5,5 avec HCl

2. Anticorps

Tableau IV : Les anticorps

Nom	Cible	Espèce	Type	Dilution	Tampon de blocage	Tampon de marquage	Tampon de lavage
α CK1.2	Ld.CK1.2	Lapin	Ac primaire Polyclonal	1/500 ^e	PBS-T 5% BSA	PBS-T 2,5% BSA	PBS-T
α HSP70	Ld.HSP70	Souris	Ac primaire Polyclonal	1/10000 ^e	Superblock 0,05% Tween 20	Superblock 0,05% Tween 20	TBS-T
α HSP83	Ld.HSP83	Souris	Ac primaire Polyclonal	1/10000 ^e	Superblock, 0,05% Tween 20	Superblock 0,05% Tween 20	TBS-T
α GSK3	Ld.GSK3	Lapin	Ac primaire Polyclonal	1/1000 ^e	TBS-T 5% lait	TBS-T 2,5% lait	TBS-T
α Lapin HRP	IgG lapin	Chèvre	Ac secondaire Monoclonal	1/20000 ^e	-	id. Ac primaire	id. Ac primaire
α Souris HRP	IgG souris	Chèvre	Ac secondaire Monoclonal	1/10000 ^e	-	id. Ac primaire	id. Ac primaire

3. Organisme : *Leishmania*

La souche *Leishmania donovani* 1S2D (MHOM/SD/62/1S-2D) clone LdB, nous a été fourni par le Pr. Stephen M. Beverley (Washington University School of Medicine, St-Louis, MO, USA). Cette souche a la particularité de pouvoir se différencier de promastigote en amastigote axénique *in vitro* après acidification du milieu de culture et élévation de la température d'incubation (Goyard et al., 2003). De plus, des données non publiées du laboratoire semblent indiquer que cette souche serait un hybride entre *L. donovani* et *L. infantum*.

4. Logiciels

Cytoscape est une plate-forme ouverte de logiciels pour la visualisation de réseaux d'interactions moléculaires et des voies biologiques, ainsi que l'intégration de ces réseaux avec des annotations, des profils d'expression des gènes et autres données d'état (<http://www.cytoscape.org/>).

Protein BLAST permet d'identifier des domaines fonctionnels connus dans une séquence protéique donnée en le comparant par similarités de séquences avec d'autres organismes référencés dans des bases de données (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

myProMS permet à l'utilisateur de centraliser et d'organiser des données de plusieurs analyses MS dans une seule base de données, mais aussi

d'accéder à la base de données via une interface Web pour télécharger, visualiser, éditer et récupérer leurs données. myProMS optimise la curation manuelle des interprétations du spectre en améliorant la visualisation des données et la comparaison au cours du processus de validation (Poulet et al., 2007).

Phyre2 permet de prédire et d'analyser la structure des protéines à partir de leur séquence protéique. Il utilise des méthodes de détection d'homologie pour construire des modèles 3D, prédire des sites de liaison de ligand et analyser les variations des acides aminés de la séquence protéique (Kelley et al., 2015) (www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/).

MEME (Multiple EM for Motif Elicitation) permet de découvrir de nouveaux motifs, sans gaps (motifs récurrents, de longueur fixe) dans des séquences protéiques (<http://meme-suite.org/>).

Progenesis SameSpots (nonlinear) permet de visualiser les protéines d'un gel 2D, mais aussi de quantifier les changements d'abondance de ces protéines (<http://www.nonlinear.com/>).

II. Méthodes

1. Biologie cellulaire

1.1. Culture de promastigotes

Les promastigotes *L. donovani* 1S2D (Matériel & méthodes I.2) sont comptés sur une lame KOVA Glasstic Slide 10 (HYCOR), puis ensemencés à une concentration de 1.10^5 promastigote/ml en milieu de culture LD1S promastigote (Tableau III) et incubée à 26°C pendant 96 h.

1.2. Différenciation de promastigotes en amastigotes axéniques

Les promastigotes *L. donovani* 1S2D (Matériel & méthodes I.2) ont la capacité de se différencier en amastigotes axéniques par un changement de pH et de température. Le milieu de culture LD1S amastigote (Tableau III), contenu dans un flacon à bouchon ventilé adapté au volume, est ensemencé avec des promastigotes, issus d'une culture en phase logarithmique, à une concentration finale de 1.10^6 promastigotes/ml. Le flacon est ensuite incubé à 37°C avec 5% de CO₂ pendant 48 h.

2. Biochimie

2.1. Extraction des protéines totales

1.10^9 promastigotes (en phase logarithmique) ou amastigotes axéniques (à 48h de différenciation), sont prélevés et centrifugés à 2500 tr/min pendant 10 min. Le surnageant est éliminé, le culot est resuspendu dans 50 ml de DPBS 1X froid (Tableau III) et centrifugé à 2500 tr/min pendant 10 min. L'étape de lavage en DPBS 1X est répétée 2 fois. Ensuite, le culot est resuspendu dans 1 ml du tampon de lyse approprié (Tableau III) avec 20 µl de Benzonase Nuclease à 25U/µl (Merck), puis le lysat est incubé pendant 30 min dans la glace avec une agitation douce. Le lysat est soniqué par ultrasons (10 s toutes les 20 s) pendant 5 min et centrifugé à 4°C pendant 15 min à 12000 g. Le surnageant est collecté et constituera l'extrait total de protéines.

2.2. Quantification des protéines

La quantification des protéines est réalisée avec le RC DC Protein Assay Kit II (Bio-Rad) en accord avec les instructions du fournisseur. La mesure

d'absorbance à 750 nm est réalisée par un spectrophotomètre Genesys 10 (Thermo Scientific) et la concentration protéique de l'échantillon est déterminée à partir de la courbe de la gamme étalon d'albumine.

2.3. SDS-PAGE

L'échantillon est ajusté à 1X NuPAGE LDS Sample buffer (Tableau III) et 1X NuPAGE sample reducing agent (Tableau III), puis incubé 10 min à 95°C, 5 min dans la glace et brièvement centrifugé. L'échantillon est chargé dans un gel Novex NuPAGE 4-12% Bis Tris, 1 mm (Life Technologies) et la migration s'effectue dans un tampon NuPAGE MES SDS Running buffer 1X (Life Technologies) à 60 V pendant 30 minutes puis 100 V jusqu'à disparition du front de migration.

2.4. Coloration au bleu de Coomassie

Le gel de polyacrylamide est lavé 3 fois pendant 1 min avec de l'eau distillée, puis les protéines contenues dans celui-ci sont colorées avec une solution de bleu de Coomassie (Tableau III) pendant 30 min. Le gel est ensuite lavé 3 fois pendant 30 min avec le tampon de décoloration Bleu de Coomassie (Tableau III).

2.5. Coloration SYPRO Ruby

Les protéines contenues dans le gel de polyacrylamide sont fixées par deux incubations de 30 min avec le tampon de fixation SYPRO Ruby (Tableau III), puis colorées pendant la nuit avec la solution SYPRO Ruby protein gel stain (Tableau III). Ensuite, le gel est lavé pendant 1 h avec le tampon de décoloration SYPRO Ruby (Tableau III), puis 5 min avec de l'eau distillée. La révélation du signal de fluorescence des protéines est réalisée par un scanner Typhoon 9400 (Amersham Biosciences).

2.6. Western blot

Transfert humide

Après séparation des protéines par SDS-PAGE, celles-ci sont transférées sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF) (Pierce) en utilisant le système Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad). La technique dite « sandwich » est utilisée pour la superposition du gel, de la membrane PVDF, des

papers Whatman et des éponges. Le transfert est réalisé à 4°C pendant 1 h à 400 mA dans du tampon de transfert 1X (Tableau III).

Marquage primaire et secondaire

Les marquages sont réalisés en accord avec les conditions décrites dans le Tableau IV, selon l'anticorps utilisé. La membrane PVDF est incubée avec le tampon de blocage (Tableau IV) pendant 1 h, puis avec le tampon de marquage (Tableau IV) contenant l'anticorps primaire pendant 1 h. Ensuite, la membrane PVDF est lavée 3 fois pendant 10 min avec le tampon de lavage (Tableau IV) et incubée avec le tampon de marquage contenant l'anticorps secondaire pendant 1 h. La membrane PVDF est lavée 3 fois pendant 10 min avec le tampon de lavage et le signal est révélé avec le réactif SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific Pierce) en accord avec les instructions du fournisseur. Le signal est ensuite visualisé par l'exposition d'un film radiographique sur la membrane ou par une camera PXi (Syngene).

Deshybridation de la membrane

La membrane PVDF peut ensuite être réutilisée, pour un nouveau Western blot, après l'ajout du réactif Restore Western Blot Stripping Reagent (Thermo Scientific Pierce) en accord avec les instructions du fournisseur.

Coloration de la membrane au bleu de Coomassie

Les protéines présentes sur la membrane PVDF sont colorées avec le BioSafe Coomassie G250 Stain (Bio-Rad) en accord avec les instructions du fournisseur.

2.7. Purification des protéines de liaison à la Staurosporine

La purification est réalisée avec le Stauro caproKit™, protocole OffBead (caprotec bioanalytique GmbH). L'extrait protéique d'intérêt est incubé pendant 60 min avec les billes magnétiques couplées à la Streptavidine, afin d'éliminer toutes les protéines endogènes biotinylées. Puis, la réaction de liaison est effectuée dans un volume de 100 µl de tampon de capture 1X contenant 100 µg d'extraits de protéines totales et 5 µM de « Staurosporine Capture Compound » (SCC). Après une incubation de 60 min à 4°C sur agitateur rotatif, les échantillons sont irradiés à 310 nm pendant 10 min en utilisant un dispositif de réticulation UV (caproBox™). Ensuite, 50 µl de billes magnétiques couplées à la Streptavidine sont ajoutées et le SCC est isolé de l'extrait protéique total en utilisant un support magnétique (caproMag™).

Finalement, le SCC est lavé 6 fois avec le tampon de lavage 1X en utilisant le caproMag™ et l'élué est réalisée avec 20 µl de tampon de Laemmli 2X et une incubation de 10 min à 95°C.

2.8. « In-Gel kinase Assay » (IGKA)

L'extrait protéique d'intérêt est déposé sur un gel d'acrylamide sans substrat et soumis à une SDS-PAGE. Ensuite, le gel est incubé avec le tampon d'élimination du SDS (Tableau III) pendant la nuit, puis équilibré avec le tampon d'équilibration IGKA (Tableau III) pendant 1 h. Les protéines contenues dans le gel sont ensuite dénaturées avec le tampon de dénaturation IGKA (Tableau III) pendant 1 h, puis renaturées avec le tampon de renaturation IGKA (Tableau III) pendant la nuit. Le lendemain, le gel est équilibré avec le tampon de réaction IGKA (Tableau III) pendant 1 h, puis incubé avec le tampon de réaction IGKA contenant 100 µCi γ -³²P-ATP pendant 1 h. L'ATP radioactif non incorporé est éliminé par 5 lavages successifs de 30 min du gel avec le tampon de lavage IGKA (Tableau III). Finalement, le gel est séché sur du papier Whatman pendant 30 min à 80°C avec un sécheur de gel (Vacuubrand), et les signaux sont révélés par l'exposition, sur le gel, d'un film radiographique avec un écran d'intensification (Kodak BioMax TranScreen-HE) (Leclercq et al., 2011).

2.9. Chromatographie d'affinité à l'ATP

La purification est réalisée avec l'ATP affinity test kit, ou le ATP AffiPur Kit I, II, III et IV (Jena Bioscience).

Equilibration des ATP-Agaroses

50 µl de chaque agarose (Blank, AP-ATP, EDA-ATP, 6AH-ATP, 8AH-ATP) sont lavés 3 fois dans 500 µl de tampon de lavage 1X froid (Tableau III), vortexé et centrifugé à 1000 g pendant 2 min.

Préparation de la solution de liaison

L'extrait protéique d'intérêt est injecté dans une cassette de dialyse Slide-A-Lyzer 10K (Fisher Bioblock Scientific) et incubé 2 fois pendant 2 h à 4°C avec agitation dans un volume de tampon de dialyse (Tableau III) équivalent à 500 fois le volume de l'échantillon. Ensuite, la cassette est incubée pendant la nuit à 4°C avec agitation dans un volume de tampon de dialyse équivalent à 1000 fois le volume de l'échantillon. Le lendemain, la solution de liaison est réalisée avec l'échantillon dialysé (dépourvu d'ATP libre) ajustée à 1X Binding buffer, 1 mM DTT et 1X Protease Inhibitor Mix.

Table V : Programmes pour Ettan IPGphor 3

Strip	Etapas	Voltage	Durée
pH 4-7	Plateau	500 V	4 h minimum
	Gradient	1000 V	1 h
	Gradient	2000 V	4 h
	Gradient	4000 V	2 h
	Gradient	8000 V	6 h
	Plateau	8000 V	2 h
pH 3-10	Plateau	500 V	4 h minimum
pH 6-11	Gradient	1000 V	1 h
	Gradient	10000 V	3 h
	Plateau	10000 V	45 min

Purification des protéines de liaison à l'ATP

La solution de liaison, préalablement préparée, est ajoutée sur les agaroses équilibrés et incubée pendant 2h30 à 4°C sur un agitateur rotatif. Ensuite, chaque agarose est centrifugé à 1000 g pendant 2 min à 4°C et le surnageant (S), contenant toutes les protéines qui ne se sont pas fixées sur l'agarose, est recueilli et conservé à -80°C. Puis, chaque agarose est lavé 3 fois avec 1 ml de tampon de lavage 1X froid. Finalement, chaque agarose est incubé avec 150 µl de tampon d'élution 1X froid (Tableau III) (correspondants à 3 volumes d'agarose) pendant 30 min à 4°C sur agitateur rotatif. Les agaroses sont centrifugés à 1000 g pendant 2 min à 4°C et l'élution (E) est recueillie. L'étape d'élution est répétée 2 fois afin d'éluer l'intégralité des protéines fixées sur l'agarose.

2.10. 2D-DiGE**Précipitation de protéines**

Les échantillons sont débarrassés de tous les réactifs pouvant interférer lors de la focalisation isoélectrique avec le ReadyPrep™ 2-D Cleanup Kit (Bio-Rad) en accord avec les instructions du fournisseur.

Réhydratation de l'Immobiline DryStrip gel

L'Immobiline DryStrip gel (IPG Strip*) est réhydratée pendant la nuit avec la DeStreak Rehydration Solution (GE Healthcare Life Sciences) ajustée à 0,5% d'IPG Buffer (GE Healthcare Life Sciences) en accord avec les instructions du fournisseur.

Marquage de l'échantillon

Le marquage des échantillons est réalisé avec le Refraction-2D™ Labelling Kit (DyeAGNOSTICS) ou le 3Dye Cy2/3/5 fluor Labeling Pack (Interchim) en accord avec les instructions du fournisseur.

Focalisation isoélectrique

L'IPG Strip réhydratée est positionnée dans l'Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare Life Sciences) en accord avec les instructions du fournisseur. Les échantillons préalablement marqués sont mélangés, complétés avec un volume égal de DeStreak Rehydration Solution (GE Healthcare Life Sciences) et chargés dans la coupe de dépôt. La séparation des protéines en fonction de leur point isoélectrique s'effectue à 20°C avec une limite de 50 µA/Strip selon la table V.

Electrophorèse bidimensionnelle sur gels Novex NuPAGE 2D well

L'IPG Strip contenant les protéines est équilibrée pendant 15 min dans l'obscurité avec 10 ml de

tampon d'équilibration DTT (Tableau III), puis avec 10 ml de tampon d'équilibration IAA (Tableau III). Ensuite, l'IPG Strip est découpée en 3 parties qui sont chargées dans des gels Novex NuPAGE 4-16% Bis-Tris 1 mm, 2D well (Life Technologies). Les puits contenant les morceaux d'IPG Strip sont scellés avec la solution d'étanchéité (Tableau III) et la migration s'effectue dans un tampon NuPAGE MES SDS Running buffer 1X (Life Technologies) à 50 V pendant 30 minutes puis 70 V jusqu'à disparition du front de migration. La révélation du signal de fluorescence des protéines est réalisée par un scanner Typhoon 9400 (Amersham Biosciences).

Electrophorèse bidimensionnelle sur 2DHPE™ Large Gels

L'équilibration de l'IPG Strip est réalisée avec les solutions contenues dans le 2DHPE™ Large Gel NF Kit (SERVA Electrophoresis GmbH) en accord avec les instructions du fournisseur. La migration s'effectue sur une HPE FlatTop Tower (GelCompany) en accord avec les instructions du fournisseur, et la révélation du signal de fluorescence des protéines est réalisée par un scanner Typhoon 9400 (Amersham Biosciences).

2.11. Test d'activité kinase *in vitro* (IVKA)

L'échantillon est ajusté à 50 mM MOPS pH 7,5, 100 mM NaCl et 10 mM MgCl₂ dans un volume final de 15 µl. La réaction est déclenchée par l'ajout de 5 µl d'une solution à 200 µM ATP, 2 µCi γ-32P-ATP. L'échantillon est incubé pendant 30 min à 37°C avec une agitation de 800 tr/min, puis transféré dans la glace pour stopper la réaction. Ensuite, l'échantillon est résolu par SDS-PAGE et les protéines contenues dans le gel sont colorées au bleu de Coomassie. Le gel est séché sur papier Whatman pendant 30 min à 80°C avec un sécheur de gel (Vacuubrand) et les signaux sont révélés par l'exposition, sur le gel, d'un film radiographique avec un écran d'intensification (Kodak BioMax TranScreen-HE).

* bandelette de plastique sur laquelle est pré-moulé un gel de Polyacrylamide contenant un gradient de pH immobilisé.

Résultats

Résultats

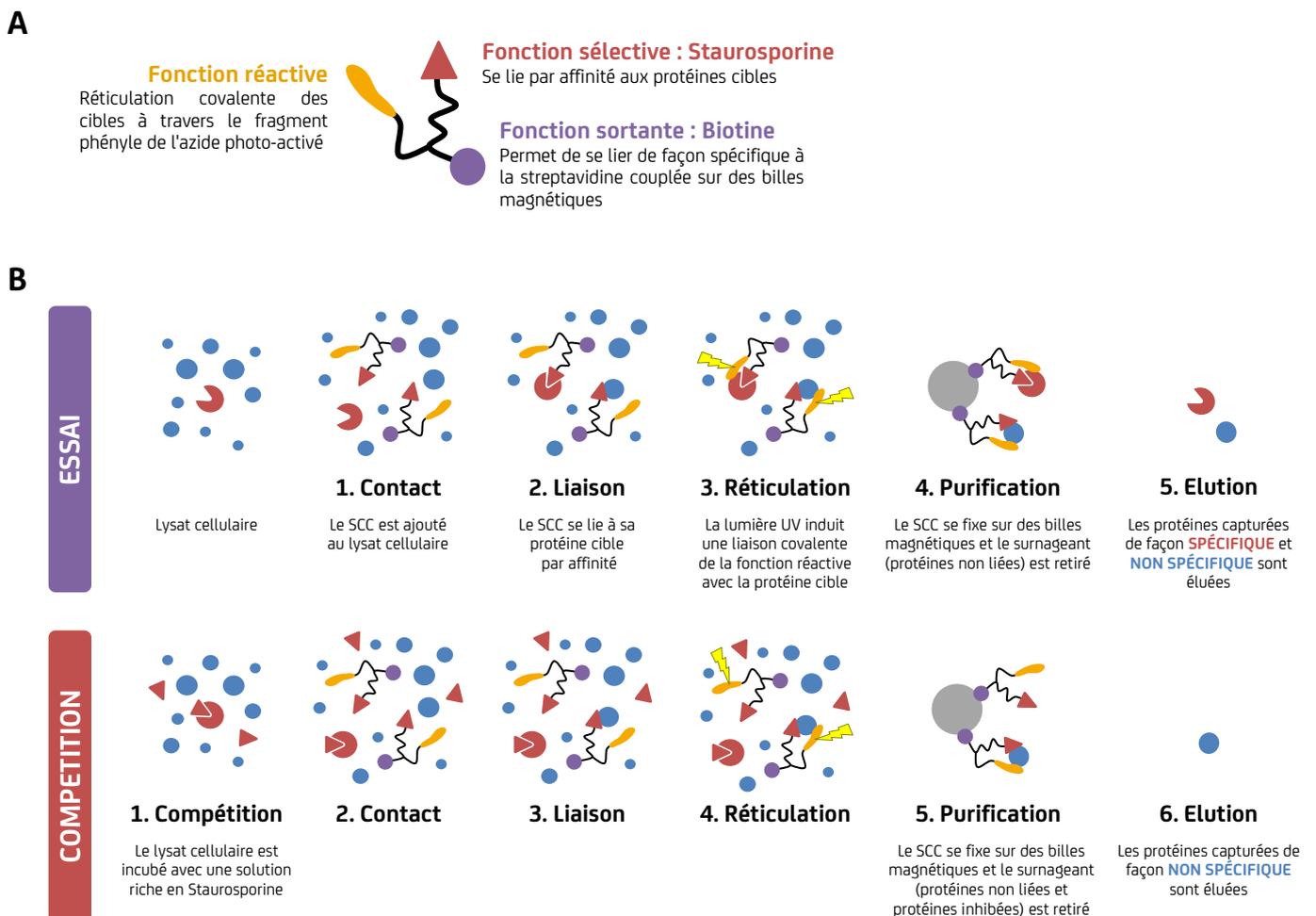


Figure 17. Purification des protéines de liaison à la Staurosporine par la méthode « Capture compound »

(A) Le « Capture Compound » (CC) est une molécule trifonctionnelle qui possède une fonction sélective (Dasatinib, Imatinib, Staurosporine), une fonction réactive et une fonction sortante, la Biotine. **(B)** Purification des protéines de liaison à la Staurosporine : Le « Staurosporine capture compound » (SCC) se lie sur les protéines cibles par interactions d'affinité renforcé par une liaison covalente entre le SCC et la protéine cible générée par la photo-réticulation. L'interaction Streptavidine-Biotine est ensuite utilisée pour isoler les protéines capturées.

(Figure adaptée de "Functional isolation of staurosporine binding protein kinases using CCMS technology", Dölsner et al., 2009).

I. Déconvolution des cibles de composés avec le « Staurosporine Capture Compound »

Parmi les méthodes biochimiques de déconvolution, l'approche basée sur l'activité était l'option qui semblait la plus appropriée à l'enrichissement du kinome de *Leishmania*. En effet, de nombreux outils ayant déjà été créés pour des études sur le Cancer et de nombreuses autres maladies, il me semblait plus perspicace d'utiliser des outils existants. Parmi ces outils disponibles, la technologie « Capture Compound » a retenu mon attention car elle peut être adaptée à n'importe quel inhibiteur.

1. La technologie « Staurosporine Capture Compound »

Le « Capture Compound » (caprotec bioanalytique GmbH) est une technologie innovante qui permet de réduire la complexité d'un échantillon biologique par l'isolement sélectif des enzymes d'une famille cible. Le « Capture Compound » (CC) est une petite molécule synthétique trifonctionnelle qui possède : une fonction réactive qui se lie de façon covalente avec la cible lors d'une exposition aux UV ; une fonction sortante, la Biotine, qui permet au CC de se lier de façon spécifique à la Streptavidine qui recouvre des billes magnétiques utilisées pour la purification ; et une fonction sélective permettant à l'inhibiteur de se lier aux enzymes de la famille cible (Figure 17A). Parmi les CCs ciblant la famille des kinases déjà disponibles, il existe trois types de fonctions sélectives : Dasatinib, Imatinib et Staurosporine (Dülsner et al., 2009; Fischer et al., 2011).

La Staurosporine est un inhibiteur générique des kinases (ATP compétitif), dont l'efficacité a été largement prouvée avec près de 253 cibles dans le kinome humain (Karaman et al., 2008). J'ai donc décidé d'utiliser le « Staurosporine Capture Compound » (SCC) pour purifier le kinome de *Leishmania* sur lequel je pourrais ensuite réaliser une déconvolution de cible avec les composés issus de nos criblages (Figure 17B). De plus, la Staurosporine étant un inhibiteur compétitif de l'ATP, l'utilisation de celle-ci nous permettra également de capturer un large spectre d'autres protéines de liaisons à l'ATP et potentiellement d'identifier de nouvelles protéines non classifiées, car aujourd'hui, sur les 9169 gènes codant pour des protéines chez *Leishmania*, seul 36% ont pu être annotés pour une fonction clairement établie (Fiebig et al., 2015; Ivens et al., 2005).

2. Enrichissement des protéines de liaison à la Staurosporine

Des extraits totaux de protéines de promastigotes et d'amastigotes axéniques de *L. donovani* ont été préparés avec un tampon de lyse IGKA (Tableau II) et quantifiés avec le kit RC DC Protein Assay II (Matériel & méthodes II.2.1 & II.2.2). Les protéines de liaison à la Staurosporine ont été isolées à partir des extraits totaux par le Stauro caproKit™, protocole « OffBead » avec ou sans compétition (Matériel & méthodes II.2.7 ; Tableau III). La compétition a été réalisée dans 100 µl de tampon de capture 1X contenant 100 µg d'extraits totaux par l'ajout de 200 µM de « Stauro Competitor » (Staurosporine libre). Après une incubation de 30 min sur agitateur rotatif, l'échantillon a été traité de la même façon que l'essai. L'excès de Staurosporine libre inhibant toutes les cibles du SCC, permet de distinguer les liaisons spécifiques de celles non-spécifiques. Ensuite, les éluions de chaque condition ont été déposées sur gel et soumises à une SDS-PAGE et une coloration SYPRO Ruby (Matériel & méthodes II.2.3 & II.2.4) (Figure 18A).

Tout d'abord, j'observe une grande différence entre le profil obtenu avec les promastigotes et celui obtenu avec les amastigotes axéniques. En effet, le nombre de protéines éluées dans l'essai (E) amastigotes est très largement supérieure à celui obtenu dans l'essai promastigotes. Par contre, je constate qu'il n'y a aucune différence entre l'essai et la compétition (C) pour les deux stades du parasite, à l'exception de deux bandes en promastigote (flèches noires) (Leclercq et al., 2013). Ces résultats semblent indiquer qu'une grande quantité de protéines est capturée de façon non-spécifique par le SCC. Il semblerait donc que ce système ne soit pas le meilleur outil pour purifier le kinome de *Leishmania*. Cependant, les kinases pouvant être faiblement

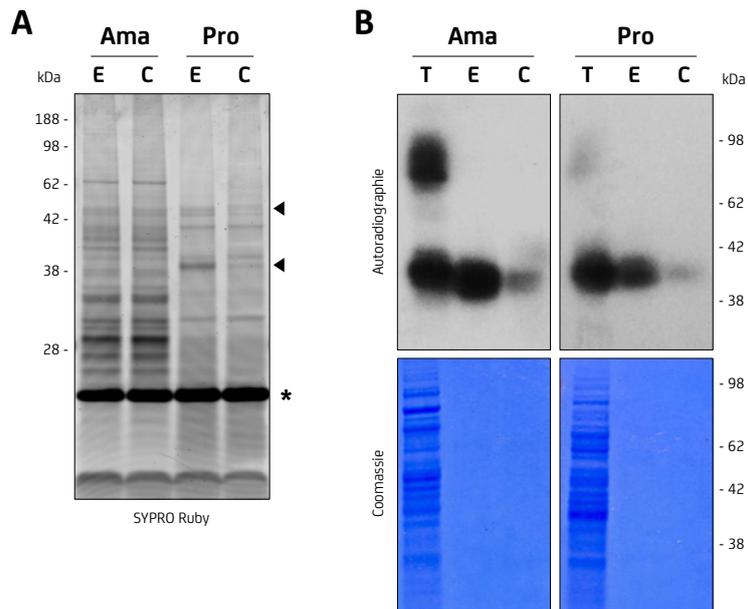


Figure 18. Analyse des protéines capturées avec le « Staurosporine Capture Compound »

Des extraits totaux de protéines de promastigotes et d'amastigotes axéniques (T) ont été soumis à un Stauro caproKit™, protocole « OffBead » (caprotec bioanalytics GmbH) en absence (E) ou en présence de Staurosporine libre (C). **(A)** Les éluions sont résolues par SDS-PAGE et soumises à une coloration SYPRO Ruby. (▲) Bandes éliminées en présence de Staurosporine libre, (*) Streptavidine. **(B)** Les éluions et l'extrait de protéines totales ont été résolus par SDS-PAGE et soumis à un IGKA. En guise de contrôle, les protéines ont été colorées au bleu de Coomassie et le signal de l'activité phosphotransférase a été révélé par l'exposition d'un film radiographique sur le gel.

(“Enrichment of *Leishmania donovani* ATP-binding proteins using a staurosporine capture compound”, Leclercq et al., 2013).

exprimées, il est possible qu'elles ne soient pas détectées par la coloration SYPRO Ruby. Pour cette raison, j'ai décidé d'utiliser une méthode de détection basée sur l'activité pour valider la présence ou non de kinases dans mes éluions.

3. Révélation de l'activité des kinases purifiées

Afin de vérifier que la compétition a fonctionné et révéler la présence des kinases dans mon enrichissement, j'ai utilisé la technique du « In-Gel Kinase Assay » (IGKA). Cette technique repose sur la co-polymérisation d'un substrat générique ou spécifique de kinases dans un gel d'acrylamide afin de caractériser l'activité phosphotransférase dans un échantillon donné (Leclercq et al., 2011; Wooten, 2002). Cependant, en l'absence de substrat dans le gel (contrôle négatif), le signal obtenu lors de la révélation provient exclusivement de l'autophosphorylation et/ou de l'activité phosphotransférase de kinases dont le substrat endogène possède un poids moléculaire proche du sien.

L'expérience précédente a été reproduite (Résultats I.1.2), mais lors de l'étape d'éluion, les billes magnétiques avec le SCC ont été resuspendues dans 100 µl d'eau ultra pure au lieu du tampon Laemmli 2X. Ensuite, 20 µg d'extraits de protéines totales et 20 µl de chaque éluion ont été soumis à un IGKA (Matériel & méthodes II.2.8) sans substrat avec une étape de coloration au bleu de Coomassie (Matériel & méthodes II.2.4) avant le séchage du gel (Figure 18B). Les profils obtenus avec les extraits totaux (T) révèlent des signaux entre 38 et 98 kDa dans les amastigotes, et entre 38 et 42 kDa dans les promastigotes (Figure 18B). Comme démontré lors d'une étude précédente (Leclercq et al., 2011), ces signaux confirment la présence de protéines capables d'autophosphoryler et/ou de phosphoryler leur(s) substrat(s) endogène(s). Ensuite, les résultats obtenus avec l'essai (E) et la compétition (C) montrent que seuls les signaux entre 38 et 42 kDa ont été conservés dans les éluions. Concernant les signaux de haut poids moléculaire observés dans l'extrait total d'amastigote uniquement, il est fort probable qu'ils soient dus à l'autophosphorylation de protéines qui ne se lient pas à la Staurosporine, telles que les protéines de choc thermique. Ensuite, en comparant les deux conditions, je remarque que les

signaux obtenus avec la compétition sont significativement réduits par rapport à l'essai pour les deux stades du parasite. Cette diminution du signal dans la compétition démontre que la présence de Staurosporine libre diminue fortement la capture des protéines responsables de ces signaux. Cela suggère que ces derniers sont probablement dus à l'activité de kinases. De plus, la coloration au bleu de Coomassie du gel montre que la quantité de protéines présentes dans l'essai et la compétition est très largement inférieure à celle de l'extrait total étant donné qu'elle est en dessous de la limite de détection du bleu de Coomassie. Donc, si je rapporte l'intensité des signaux observés sur l'autoradiographie à la quantité de protéines présentes dans le gel, je peux affirmer que les signaux obtenus avec les essais et les compétitions sont dramatiquement plus forts que ceux observés pour les extraits totaux. Il y a donc bien eu un enrichissement spécifique de kinases dans mes éluions.

Ces résultats indiquent donc très clairement que le SCC a permis de capturer des protéines ayant une activité phosphotransférase et qui du fait de leurs poids moléculaires, pourraient être des kinases. Toutefois, la méthode IGKA permet de révéler uniquement l'activité des protéines capables de se renaturer après dénaturation, ce qui pourrait expliquer l'absence d'activité des kinases avec un poids moléculaire supérieur ou inférieur aux signaux observés. Il aurait probablement été plus judicieux de réaliser la méthode *in vitro* kinase assay qui nous aurait permis de visualiser l'intégralité des activités d'autophosphorylation et phosphotransférase sans dénaturation et renaturation des protéines.

4. Approche comparative CCMS

En collaboration avec caprotec bioanalytics GmbH (Berlin, Allemagne), nous avons ensuite utilisé une approche comparative « Capture Compound Mass Spectrometry » (CCMS) pour identifier les protéines spécifiquement capturées par le SCC. J'ai préparé trois répliquats biologiques de protéines totales de promastigotes et d'amastigotes axéniques, puis mes collaborateurs ont réalisés les compétitions, les purifications, les analyses en spectrométrie de masse et l'analyse des données. Ces analyses ont permis d'identifier 1301 et 1329 protéines respectivement en promastigotes et amastigotes axéniques. Après

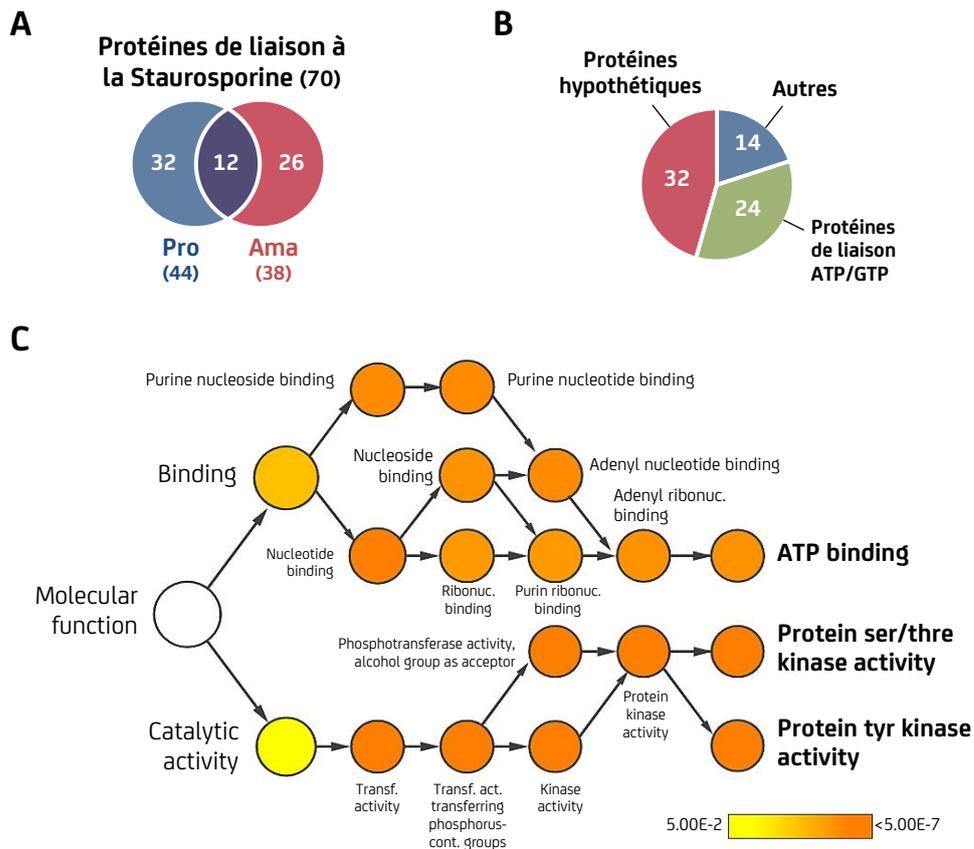


Figure 19. Protéines identifiées par CCMS et analyse fonctionnelle

(A) Diagrammes de Venn du nombre de protéines identifiées par MS dans les éluions des promastigotes (Pro) et des amastigotes axéniques (Ama). (B) Graphique circulaire représentant le nombre de protéines classées par fonction après validation. (C) Représentation des catégories de fonctions moléculaires GO identifiées et visualisées avec le plugin BINGO du logiciel Cytoscape. Le niveau de couleur indique le niveau d'erreur de type I (p-value) après correction des faux positifs.

(“Enrichment of *Leishmania donovani* ATP-binding proteins using a staurosporine capture compound”, Leclercq et al., 2013).

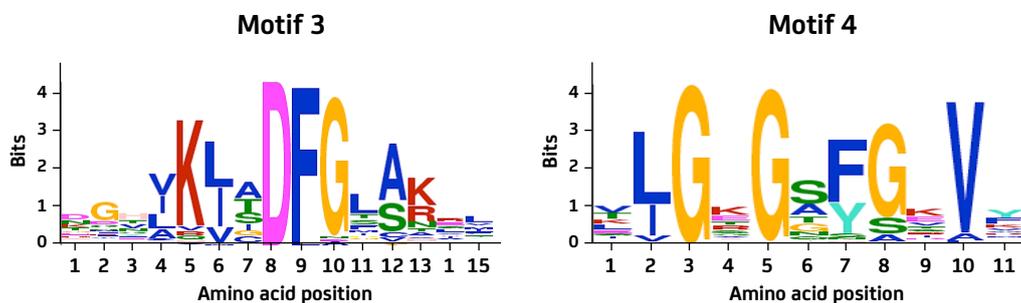


Figure 20. Représentation des motifs de liaison à la Staurosporine

Représentation des motifs de liaison à la Staurosporine les plus significatifs après évaluation sur les 253 protéines kinases humaines connues pour être inhibées par la Staurosporine. Le motif 3 long de 15 résidus contient l'élément de régulation de séquence DFG, et le motif 4 long de 11 résidus comprend le motif GxGxxG, connu pour être impliqué dans la liaison de l'ATP.

(“Enrichment of *Leishmania donovani* ATP-binding proteins using a staurosporine capture compound”, Leclercq et al., 2013).

élimination des protéines non spécifiques identifiées dans la compétition, 70 protéines ont finalement été validées (Annexe 1), avec 44 protéines identifiées en promastigote et 38 en amastigote axéniques. Parmi ces protéines, 32 sont spécifiques du stade promastigote et 26 du stade amastigote axénique (Figure 19A). De plus, 24 protéines ont été identifiées comme liant l'ATP ou le GTP et 32 comme protéines hypothétiques potentiellement capables de lier la Staurosporine (Figure 19B).

Afin d'évaluer la spécificité et l'efficacité du SCC, une série d'analyses bio-informatiques a été réalisée en collaboration avec le Centre for Molecular Bioinformatics (University of Rome Tor Vergata, Rome, Italie). Tout d'abord, ils ont effectué une analyse de l'enrichissement fonctionnel en utilisant la base de données « Gene Ontology » de *L. infantum* (www.tritrypdb.org) et le plugin BiNGO du logiciel Cytoscape. Cette analyse a révélé une surreprésentation de la fonction « ATP binding » et de la fonction kinase, validant ainsi la spécificité du SCC pour les kinases (Figure 19C).

Ensuite, afin d'évaluer l'efficacité du SCC, ils ont combiné des algorithmes permettant l'alignement de séquences protéiques et de recherche de motifs avec des analyses de structures et les données disponibles dans la littérature scientifique, pour finalement identifier 6 motifs de liaison à la Staurosporine. Chacun de ces motifs a été recherché dans les séquences protéiques des 253 protéines kinases humaines connues pour être inhibées par la Staurosporine (Karaman et al., 2008), et les motifs 3 et 4 ont été identifiés comme étant les plus significatifs (Figure 20). Ensuite, ces motifs ont été recherchés dans les séquences protéiques du protéome de *L. infantum* et 59 protéines kinases, soit 17,8% du kinome, ont pu être validées comme de potentielles protéines de liaison à la Staurosporine. Parmi ces protéines kinases, 22 ont été capturées par le SCC, permettant alors d'estimer l'efficacité du SCC à 40%.

Pour finir, ils ont réalisé une recherche des domaines de liaison à l'ATP connus (Smart, PFAM, PROSITE) sur les protéines hypothétiques capturées par le SCC, mais la recherche a été largement infructueuse avec seulement 2 protéines hypothétiques validées : LinJ.20.0280, homologue de la protéine chaperon nucléaire Midasin qui contient plusieurs sites de liaison ATP, et LinJ.09.1630 qui possède un domaine

SMC (Structural Maintenance of Chromosomes) impliqué dans l'organisation et la ségrégation des chromosomes. L'enrichissement de protéines hypothétiques par le SCC est donc très probablement dû à une co-purification via des partenaires d'interaction capables de lier la Staurosporine, ou à la présence d'un domaine de liaison à l'ATP inconnu, spécifique au parasite, qui pourrait interagir avec cet inhibiteur compétitif de l'ATP.

5. Conclusion

Le CC est une technologie innovante qui permet de réduire la complexité d'un échantillon biologique par l'isolement sélectif d'une famille d'enzymes cibles. En utilisant le SCC, j'ai pu recueillir des informations importantes sur les cibles cellulaires de cet inhibiteur générique de kinases chez *Leishmania*, mais également confirmer des résultats préalablement obtenus dans le laboratoire. En 2012, une étude portant sur les effets de la Staurosporine sur *L. donovani* en culture a mis en évidence que celle-ci causait des défauts de motilité et de prolifération du parasite (Foucher et al., 2012). Basé sur ce phénotype, il a été supposé que la Staurosporine devait cibler le flagelle du parasite et le cycle cellulaire. En accord avec ces suppositions, mes données ont montré que le SCC était capable de capturer des kinases impliquées dans ces processus comme la MAP kinase 9 (LinJ.19.0170), connue pour être impliquée dans la biogénèse flagellaire, et la protéine LinJ.27.2570 (kinase CDK-like) impliquée dans le contrôle de la croissance (Leclercq et al., 2013).

Finalement, le « Staurosporine Capture Compound » n'a pas été retenu comme méthode pour la déconvolution de cibles étant donné le faible nombre de protéines spécifiquement capturées (70) et le nombre encore plus faible de kinases identifiées (23, soit 7,9% du kinome référencé sur TritrypDB pour *L. infantum*). Cette approche utilisant la Staurosporine ne semble donc pas suffisante et il aurait été intéressant de rajouter les autres CC liés à la Dasatinib et l'Imatinib, afin de voir s'il était possible d'augmenter le nombre de kinases capturées avec l'ensemble de ces inhibiteurs. Cependant, étant donné le coût élevé de cette technologie et le nombre important de protéines capturées de façon non-spécifique (94%) imposant l'utilisation d'une compétition à chaque essai,

j'ai préféré utiliser une approche beaucoup plus large et plus générale. Les approches utilisant des inhibiteurs spécifiques de kinases comme le CC (Fischer et al., 2011) ou les Kinobeads (Bantscheff et al., 2007a; Urbaniak et al., 2012) se sont avérées être efficaces mais se cantonnent uniquement à certains groupes de kinases. Afin de pallier ce problème, je me suis orienté vers une approche plus physiologique et moins sélective exploitant la molécule d'ATP pour capturer l'ensemble des protéines de liaison à l'ATP : l'ATPome.

Toutefois, les protéines hypothétiques capturées avec le SCC pourraient être intéressantes à étudier pour différentes raisons. En effet, près de 60% du protéome de *Leishmania* est aujourd'hui considéré comme hypothétique (Fiebig et al., 2015; Ivens et al., 2005) et il n'est pas exclu qu'une partie de ces protéines possèdent des domaines spécifiques au parasite. Il serait donc intéressant de déterminer si les protéines hypothétiques capturées par le SCC sont capables de lier l'ATP. Si tel est le cas, il faudrait vérifier si elles possèdent un domaine de liaison à l'ATP conventionnel ou dégénéré, ou alors, un quelconque autre domaine jamais identifié pour cette fonction. Dans ce but, je collabore actuellement avec

le Seattle Biomedical Research Institute (Seattle Structural Genomics Center for Infectious Disease) qui réalise le clonage d'une sélection des protéines hypothétiques capturées dans un vecteur d'expression bactérien afin que je puisse confirmer leur capacité à lier l'ATP directement, et ainsi compléter l'annotation fonctionnelle du génome de *Leishmania*. De plus, ces protéines hypothétiques pourraient également constituer de nouvelles cibles médicamenteuses étant donné qu'elles sont totalement spécifiques du parasite.

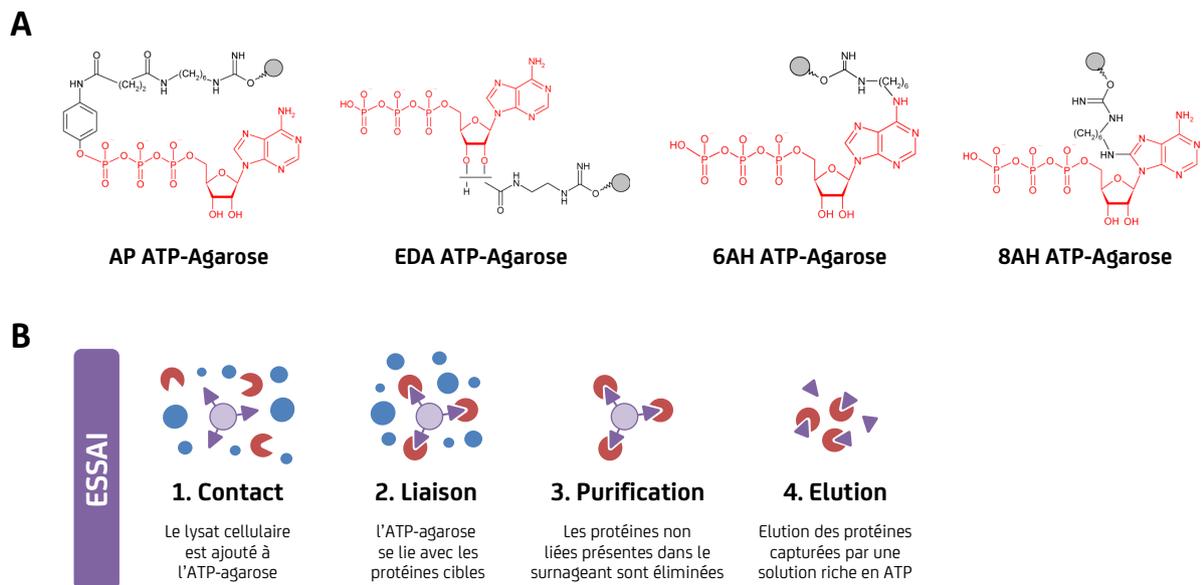


Figure 21. Purification des protéines de liaison à l'ATP en utilisant l'ATP-Agarose

(A) Structure des 4 ATP-Agaroses contenues dans le ATP Affinity Test Kit (Jena Bioscience). **(B)** Représentation schématique de la chromatographie d'affinité à l'ATP : l'échantillon dépourvu d'ATP est mis en contact avec l'ATP-Agarose, puis les protéines capables de lier l'ATP vont s'accrocher sur l'ATP-Agarose. Les protéines non liées présentes dans le surnageant sont éliminées et l'élution des protéines capturées est réalisée par compétition grâce à l'ajout d'une solution riche en ATP.

(<http://www.jenabioscience.com/>).

II. Déconvolution des cibles de composés par chromatographie d'affinité à l'ATP

La méthode biochimique basée sur l'activité, utilisant le SCC, n'ayant pas permis d'identifier un nombre de kinases suffisant afin de réaliser une déconvolution de cibles, j'ai décidé d'utiliser une approche plus générale, basée sur l'affinité, visant à purifier l'ensemble des protéines de liaison à l'ATP (ATPome).

1. Enrichissement de l'ATPome de *L. donovani*

1.1. Purinome et ATPome

Les purines sont des molécules azotées hétérocycliques (C₅H₄N₄) importantes dont certains dérivés entrent dans la composition des acides nucléiques (adénine et guanine). On les retrouve également dans des cofacteurs essentiels pour de nombreuses réactions enzymatiques au sein des organismes vivants (ATP, GTP, AMP cyclique, NADP, SAM ou coenzyme A), et les protéines qui les utilisent constituent le Purinome. Parmi ces cofacteurs, la molécule d'ATP (adénosine triphosphate) est particulièrement importante car elle se lie à de nombreuses protéines impliquées dans de nombreux processus cellulaires tels que, le métabolisme, la synthèse, le transport actif, la signalisation cellulaire et le maintien de la structure cellulaire (Murray and Bussiere, 2009).

Les protéines qui constituent l'ATPome ont évolué de différentes façons pour reconnaître spécifiquement l'ATP : soit par le groupement phosphate, soit par la base adénine. La séquence la plus courante de liaison de l'ATP est le motif Walker-A (P-loop) qui comprend de nombreuses variations. Ce motif est également présent chez les protéines de liaison au GTP (Guanosine triphosphate). Contrairement au motif P-loop, la reconnaissance de la base adénine se fait essentiellement par des motifs structuraux conservés, encore mal connus, via des liaisons hydrogènes. Il faut également noter que d'autres motifs (A-loop et Q-loop) et structures bien définies (ATP-grasp fold) ont également la capacité de lier l'ATP (Matte and Delbaere, 2010).

Chez *L. infantum*, 535 protéines de liaison à l'ATP sont référencées dans la base de données TriTrypDB (GO : 0005524). Actuellement, aucune étude sur, ou exploitant, l'ATPome de *Leishmania* n'existe, et les seules données existantes dans la littérature scientifique proviennent de *T. brucei* (Urbaniak et al., 2012). L'enrichissement de celui-ci et l'identification

des protéines qui le composent, pourraient être d'une grande utilité à la communauté scientifique pour une meilleure compréhension des voies métaboliques de *Leishmania*.

1.2. Chromatographie d'affinité à l'ATP

Pour purifier l'ATPome de *Leishmania*, j'ai opté pour une méthode biochimique basée sur l'affinité à l'ATP. Le problème fondamental de l'utilisation de l'ATP dans la chromatographie d'affinité est qu'il doit être modifié chimiquement pour être fixé à une matrice. Or l'ajout d'un domaine de liaison peut potentiellement interférer dans l'interaction protéine-ATP. Pour cette raison, j'ai décidé d'utiliser les kits vendus par Jena Bioscience, car ils ont contourné ce problème en immobilisant l'ATP sur l'agarose de différentes façons : via la base adénine, le sucre ou le groupement phosphate de l'ATP (Figure 21A). Chacune de ces stratégies de liaison a un effet caractéristique sur les interactions protéine-ATP, et permet la purification d'une plus grande variété de protéines de liaison à l'ATP. Les kits proposés par Jena Bioscience proposent un panel de 5 agaroses :

- L'agarose seul comme contrôle (Blank).
- L'AP ATP-Agarose (Aminophenyl-ATP-Agarose, C10-spacer) sur lequel l'ATP est immobilisé via le groupement phosphate avec un segment de liaison.
- L'EDA ATP-Agarose (2'/3'-EDA-ATP-Agarose) sur lequel l'ATP est immobilisé via un fructose modifié.
- Le 6AH ATP-Agarose (N6-(6-Amino)hexyl-ATP-Agarose) sur lesquels l'ATP est immobilisé via le carbone 6 de la base adénine.
- Le 8AH ATP-Agarose (8-[(6-Amino) hexyl]-amino-ATP-Agarose) sur lesquels l'ATP est immobilisé via le carbone 8 de la base adénine.

La chromatographie d'affinité à l'ATP se réalise en « batch » de façon conventionnelle dont le principe est schématisé dans la Figure 21B (Matériel & méthodes II.2.9)

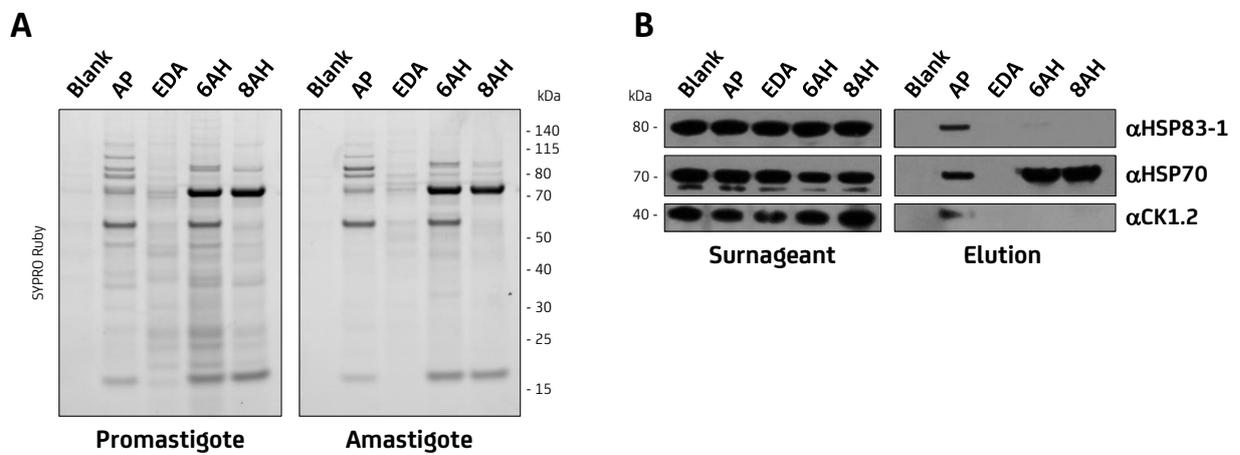


Figure 22. Visualisation et caractérisation des protéines capturées avec l'ATP-Agarose

(A) Des extraits totaux de protéines de promastigotes et d'amastigotes axéniques ont été soumis à une chromatographie d'affinité à l'ATP sur chacun des ATP-Agaroses (Blank, AP, EDA, 6AH, 8AH). Les éluions ont été résolues par SDS-PAGE et soumises à une coloration SYPRO Ruby. **(B)** Les éluions et les surnageants obtenus en (A) ont été résolus par SDS-PAGE et analysés par Western Blot avec des anticoprs anti-HSP83-1, -HSP70 et -CK1.2.

1.3. Visualisation des protéines capturées avec les ATP-Agaroses

Dans un premier temps, j'ai réalisé une chromatographie d'affinité à l'ATP avec chaque ATP-Agarose afin de valider leur efficacité et visualiser l'ATPome des promastigotes et amastigotes axéniques.

Des extraits totaux de protéines de promastigotes et d'amastigotes axéniques de *L. donovani* ont été réalisés avec un tampon de lyse TRITON (Tableau III) et quantifiés avec le kit RC DC Protein Assay II (Matériel & méthodes II.2.1 & II.2.2). Puis, 500 µg de chaque extrait total ont été soumis à une chromatographie d'affinité en utilisant chacun des Agaroses (Blank, AP-ATP, EDA-ATP, 6AH-ATP, 8AH-ATP) (Matériel & méthodes II.2.9). Puis, les 3 éluions obtenues avec chaque Agarose ont été réunies et concentrées dans un volume final de 100 µl avec des filtres Amicon Ultra 10K (Millipore). Ensuite, 15 µl de l'éluion de chaque Agarose ont été déposés sur gel et soumis à une SDS-PAGE, puis à une coloration SYPRO Ruby (Matériel & méthodes II.2.3 & II.2.5) (Figure 22A). Tout d'abord, j'observe qu'il n'y a aucune protéine dans l'éluion obtenue avec le contrôle Agarose (Blank), ce qui me permet de valider la spécificité des protéines capturées avec les ATP-Agaroses. Ensuite, les profils obtenus pour chaque ATP-Agarose sont quasiment identiques entre les stades promastigote et amastigote axénique, contrairement à ce que j'ai précédemment obtenu avec le SCC. Par contre, il y a des différences de profils entre les différents ATP-Agaroses (AP, EDA, 6AH, 8AH). Ces résultats suggèrent que chacun des ATP-Agarose a permis la capture de protéines différentes, validant ainsi la stratégie qui consistait à utiliser de l'ATP immobilisé de différentes façons. Toutefois, quelques protéines majoritaires ont été capturées par plusieurs ATP-Agaroses, ainsi pour AP, 6AH et 8AH j'observe une bande bien distincte à 70 kDa qui pourrait correspondre à la protéine de choc thermique HSP70 qui est très abondante chez *Leishmania* et capable de lier l'ATP.

Afin de déterminer plus précisément quelles protéines ont été capturées, j'ai réalisé des Western Blots avec les éluions amastigote en utilisant des anticorps reconnaissant des protéines connues pour lier l'ATP. Pour cela, 8 µl des surnageants (protéines qui ne se sont pas liées) et 15 µl des éluions de chaque Agarose ont été soumis à une SDS-PAGE et analysés par Western blot en utilisant un anticorps

anti-HSP83-1. Ensuite, les membranes ont été deshybridées pour être marquées à nouveau avec d'autres anticorps (anti-HSP70, anti-CK1.2) (Matériel & méthodes II.2.3 & II.2.6 ; Tableau IV) (Figure 22B).

Dans un premier temps, je constate l'absence de signal pour les trois cibles avec le contrôle Agarose (Blank) confirmant encore une fois la spécificité des résultats obtenus avec la coloration SYPRO Ruby. Ensuite, je remarque la présence d'un signal au poids moléculaires attendus pour HSP83-1 (78,8 kDa), HSP70 (71,3 kDa) et CK1.2 (39,8 kDa) dans tous les surnageants. Ces résultats valident la technique de détection de ces protéines, mais aussi indiquent que l'ATP-Agarose n'est pas capable de capturer l'intégralité de ces protéines dans l'extrait total. Pour les éluions, je détecte la présence d'un signal pour HSP83-1, HSP70 et CK1.2 dans AP, indiquant que ces trois protéines ont été capturées avec cet ATP-Agarose. Pour EDA, je n'observe aucun signal, donc aucune de ces protéines n'a pu être capturée par cet ATP-Agarose. Et finalement, pour 6AH et 8AH, j'observe la présence d'un signal important seulement pour HSP70 indiquant qu'une grande quantité de cette protéine a été capturée par ces ATP-Agaroses. De plus, les différences dans l'intensité du signal observée pour HSP70 dans AP, 6AH et 8AH correspondent aux différences d'intensité observées sur le SYPRO Ruby pour la bande à 70 kDa, suggérant qu'il pourrait s'agir de HSP70. Ces résultats semblent indiquer que l'AP-ATP-Agarose pourrait être le plus efficace des ATP-Agaroses, car il est le seul à avoir capturé l'ensemble de protéines testées, dont la caséine kinase 1.2. Toutefois, la détection de trois protéines de liaison à l'ATP, parmi les 535 protéines annotées pour cette fonction, n'est pas suffisante pour sélectionner préférentiellement un ATP-Agarose par rapport aux autres.

1.4. Validation des protéines capturées par compétition à l'ATP

Afin de déterminer que les protéines capturées dans mes précédentes éluions sont dues à une interaction avec l'ATP-Agarose, j'ai effectué une compétition avec de l'ATP. Pour cela, j'ai réalisé deux compétitions : une préalablement à la purification (ATP1) et une autre en même temps que la purification (ATP2) afin de déterminer laquelle serait la plus efficace (Figure 23A). Pour la compétition ATP1, l'extrait total de protéines, obtenu après dialyse, a été ajusté à 20 mM ATP, 10 mM MgCl₂ et

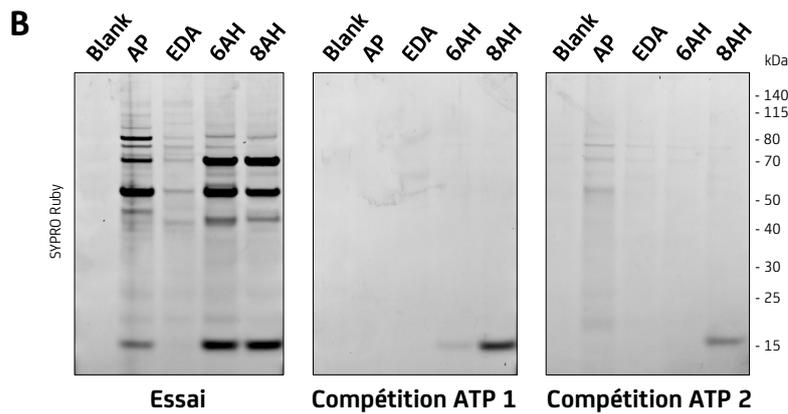
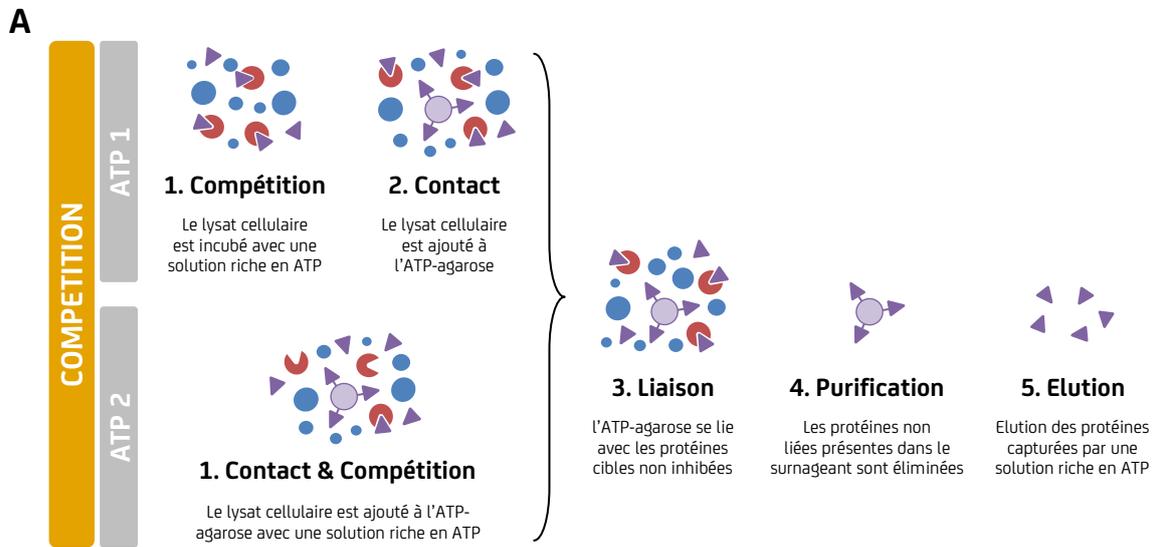


Figure 23. Validation des protéines capturées par compétition à l'ATP

(A) Représentation schématique des compétitions à l'ATP. (B) Un extrait total de protéines d'amastigotes axéniques a été soumis à une chromatographie d'affinité à l'ATP sur chacun des ATP-Agaroses avec ou sans compétition à l'ATP préalable. Les éluents ont été soumis à une SDS-PAGE, puis une coloration SYPRO Ruby.

incubé pendant 30 min à 37°C avec une agitation de 800 tr/min. Ensuite, la purification a été réalisée comme décrit précédemment (Matériel & méthodes II.2.9). Pour la compétition ATP2, la solution de liaison (contenant l'extrait total) a été ajustée à 20 mM ATP sans MgCl₂ car le 5X Binding Buffer ajouté lors de la préparation de cette solution contient déjà 300 mM de MgCl₂. Puis, la solution de liaison a été directement ajoutée à chaque ATP-Agarose, et la purification a été réalisée comme décrit précédemment (Matériel & méthodes II.2.9). Un Essai sans compétition a également été réalisé en parallèle en guise de contrôle positif. Finalement, les trois éluions obtenues pour chaque condition ont été réunies et concentrées dans un volume final de 80 µl avec des filtres Amicon Ultra 10K (Millipore). Ensuite, 20 µl de chaque éluion ont été soumis à une SDS-PAGE, puis une coloration SYPRO Ruby (Matériel & méthodes II.2.3 & II.2.5) (Figure 23B).

Les profils de coloration de l'Essai (sans compétition) sont identiques à ceux obtenus précédemment, ce qui semble indiquer que cette technique est reproductible. Pour la compétition ATP1, il y a une absence totale de protéines, hormis une bande marquée à 15 kDa pour 8AH et plus faible pour 6AH, alors que pour la compétition ATP2, il subsiste encore des protéines même si elles sont en quantité très faible en comparaison avec l'Essai, indiquant que la compétition n'a été que partielle. Ainsi, les résultats suggèrent que la compétition ATP1 est la plus efficace, et que cette efficacité serait due à l'incubation préalable de l'extrait total de protéines avec l'ATP. Néanmoins, quelle que soit la méthode utilisée, je remarque une absence quasi-totale de protéines dans les éluions après compétition avec l'ATP. Ces résultats confirment que les protéines obtenues dans l'Essai sont réellement dues à une interaction avec l'ATP-Agarose. Toutefois, cette expérience ne me permet pas de distinguer s'il s'agit d'une capture directe ou indirecte via une protéine partenaire capable de lier l'ATP.

1.5. Identification des protéines capturées avec les ATP-Agaroses

Afin d'identifier les protéines qui ont été capturées avec chaque ATP-Agarose, j'ai fait analyser mes éluions en spectrométrie de masse (MS) par le Laboratoire de Spectrométrie de Masse Protéomique de l'Institut Curie. Pour cela, des extraits totaux de protéines de promastigotes et d'amastigotes

axéniques, ont été soumis à une chromatographie d'affinité à l'ATP comme décrit précédemment (Matériel & méthodes II.2.9), puis les éluions de chaque ATP-Agarose ont été analysées par GeLC-MS/MS (Piersma et al., 2013). Les données ont été analysées avec le logiciel myProMS (Matériel & méthodes II.4) sur la base de données TriTrypDB de *L. infantum* JPCM5 étant donné que le séquençage du génome de la souche MHOM/SD/62/15-2D n'est pas encore disponible, et que la base de données de *L. donovani* BPK282A1 est très mal annotée. Ensuite, les protéines identifiées dans les promastigotes et les amastigotes axéniques ont été comparées dans des diagrammes de Venn (Figure 24A).

Ces analyses ont permis d'identifier 374 protéines dans l'ensemble de mes éluions, dont 181 en promastigote et 331 en amastigote. Parmi ces protéines, 92 sont annotées comme interagissant avec l'ATP (GO : 0005524) dont 29 kinases et 12 protéines de choc thermique (HSPs). Tout d'abord, je remarque que l'enrichissement a été presque deux fois plus efficace en amastigote qu'en promastigote, mais cette expérience n'ayant été réalisée qu'une seule fois, il serait judicieux de la répéter afin de déterminer si cela est dû à la biologie du parasite, ou à un artefact expérimental. Ensuite, je n'ai capturé que 92 des protéines de liaison à l'ATP dont 29 kinases sur les respectivement 535 et 288 protéines référencées sur TritypDB, ce qui est insuffisant pour réaliser une déconvolution de cibles. Pour les 282 protéines non annotées comme liant l'ATP, il est fort possible qu'elles aient été co-purifiées lors du processus d'enrichissement, ou alors, qu'elles ne soient pas correctement annotées. En effet, en étudiant le descriptif des protéines identifiées dans les bases de données, j'ai relevé que 8 kinases n'avaient pas été annotées pour cette fonction (Annexe 2). Donc, étant donné le caractère incomplet des annotations des bases de données, il m'est difficile d'estimer précisément le nombre de protéines spécifiquement capturées par l'ATP-Agarose, d'autant plus, que parmi ces protéines, on retrouve également des protéines hypothétiques, dont on ne sait pas si elles fixent ou non l'ATP.

Afin de déterminer l'efficacité des ATP-Agaroses individuellement, j'ai analysé le nombre de protéines de liaison à l'ATP et le nombre de kinases identifiées pour chaque ATP-Agarose dans des Diagrammes de Venn (Figure 24B). Concernant les protéines de liaison à l'ATP, j'observe un plus faible nombre de

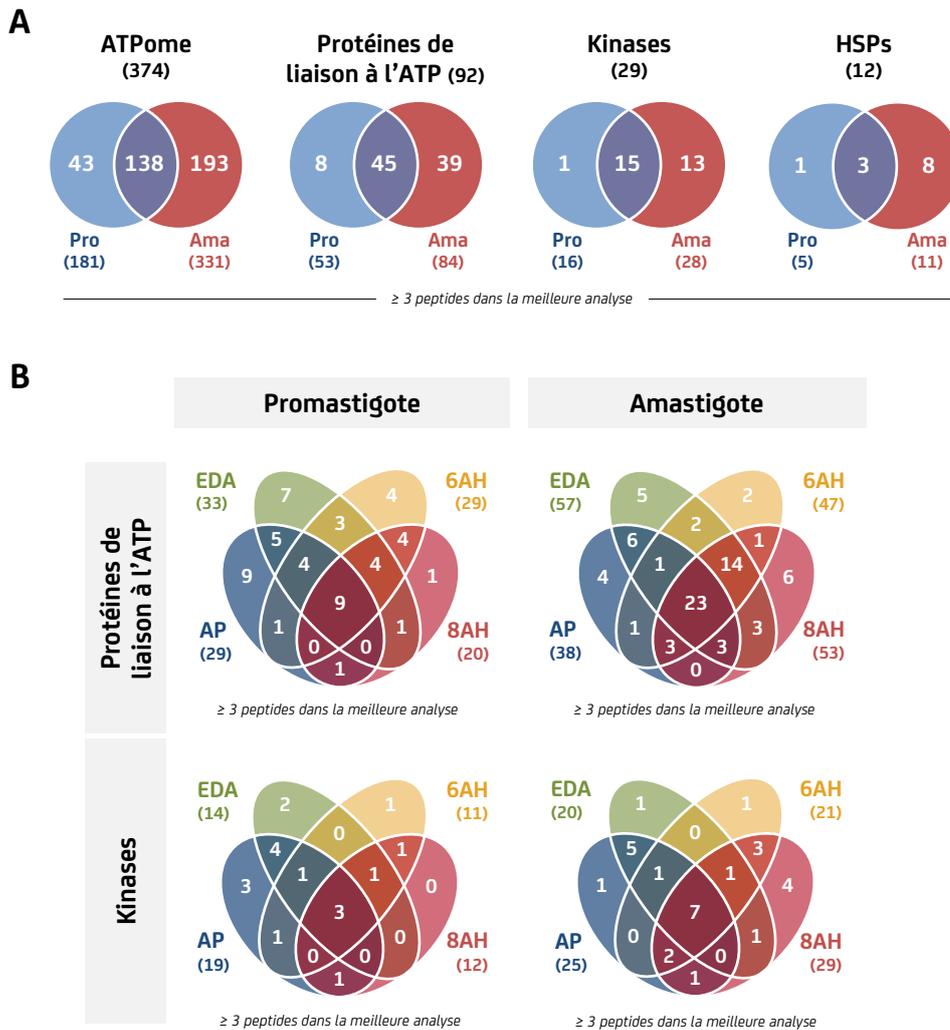


Figure 24. Identification des protéines capturées avec l'ATP-Agarose

Des extraits totaux de protéines de promastigotes ou d'amastigotes axéniques ont été soumis à une chromatographie d'affinité à l'ATP sur chacun des ATP-Agaroses (Blank, AP, EDA, 6AH, 8AH). Les éluions ont été analysées en spectrométrie de masse (MS). **(A)** Diagrammes de Venn des protéines identifiées en promastigotes (Pro) et amastigotes axéniques (Ama). **(B)** Diagrammes de Venn des protéines de liaison à l'ATP (GO : 0005524) et des kinases identifiées en promastigote et amastigote axéniques en fonction de l'ATP-Agarose utilisé.

protéines capturées avec l'ATP-Agarose 8AH en promastigote, et AP en amastigote, indiquant que ces ATP-Agaroses pourraient avoir une moins bonne efficacité que les autres. Toutefois, ce phénomène n'est pas observé pour les kinases capturées. En effet, en promastigote, les ATP-Agaroses EDA, 6AH et 8AH ont permis de capturer respectivement 14, 11 et 12 kinases tandis que AP en a capturé 19, alors qu'en amastigote, 20 et 21 kinases ont été capturées pour les ATP-Agaroses EDA et 6AH, contre 25 et 29 pour AP et 8AH respectivement. De plus, je remarque que chacun des ATP-Agaroses a capturé spécifiquement des protéines de liaison à l'ATP et de kinases qui n'ont pas été capturées par les autres. Donc, il semblerait que la majorité des protéines de liaison à l'ATP (kinases incluses) soient capturées par l'ensemble des ATP-Agaroses, mais aussi qu'un nombre non négligeables de protéines soient capturées spécifiquement par chacun des ATP-Agaroses. Par conséquent, ces résultats suggèrent qu'il est indispensable d'utiliser les 4 ATP-Agaroses afin de capturer le maximum de protéines, ainsi, toutes les expériences suivantes seront réalisées avec un mélange des 4 ATP-Agaroses (1/4 de chaque ATP-Agarose). Toutefois, des réplicats biologiques seraient nécessaires afin de valider définitivement ces résultats.

Pour conclure, la chromatographie d'affinité à l'ATP a permis de capturer 17,2 % des protéines de liaison à l'ATP et 10 % des kinases référencées (TritypDB). En comparaison avec le SCC, je n'ai pu accroître que faiblement le nombre de kinases capturées, et

celui-ci reste encore insuffisant pour réaliser une déconvolution de cibles de composé. Toutefois, ce faible nombre de protéines de liaison à l'ATP et de kinases pourrait s'expliquer de plusieurs façons. Cela pourrait être dû à (i) une absence ou une trop faible quantité de ces protéines dans les extraits totaux de protéines, (ii) une incapacité de ces protéines à se fixer sur les ATP-Agaroses en raison d'un encombrement ou d'une inactivation de la poche de liaison à l'ATP (complexe protéique, kinases inactives), (iii) une limitation de la méthodologie, ou (iv) une saturation des ATP-agaroses ou du spectromètre de masse, par certaines protéines très abondantes telles que les protéines de choc thermique (6 des 10 protéines les plus abondantes dans la précédente analyse MS). Il est donc indispensable d'étudier ces hypothèses afin de conclure sur la réelle efficacité de l'ATP-Agarose.

2. Optimisation de la chromatographie d'affinité à l'ATP

Afin d'obtenir un nombre de protéines de liaison à l'ATP et de kinases suffisant pour réaliser une déconvolution de cibles, j'ai procédé à de nombreuses optimisations de la chromatographie d'affinité à l'ATP.

2.1. Détermination des conditions de lyse des parasites

2.1.1. Détermination de la limite de saturation de l'ATP-Agarose et comparaison entre les tampons de lyse TRITON et RIPA

Les premières optimisations ont portées sur la déterminer de la limite de saturation de l'ATP-Agarose en extrait protéique, et la recherche du tampon de lyse qui solubiliserait le maximum de protéines de liaison à l'ATP. Pour cela, j'ai réalisé

plusieurs chromatographies d'affinité à l'ATP avec différentes quantités d'extraits totaux préalablement obtenus avec un tampon de lyse TRITON (précédemment utilisé) ou un tampon de lyse RIPA.

Les extraits totaux de protéines ont été réalisés à partir d'une culture d'amastigotes axéniques avec un tampon de lyse TRITON (1% TRITON X-100) ou RIPA 1X (1% NP40, 1% SDC) (Tableau III), et quantifiés avec le kit RC DC Protein Assay II (Matériel & méthodes II.2.1 & II.2.2). Puis, des solutions de liaison ont été réalisées avec cinq quantités

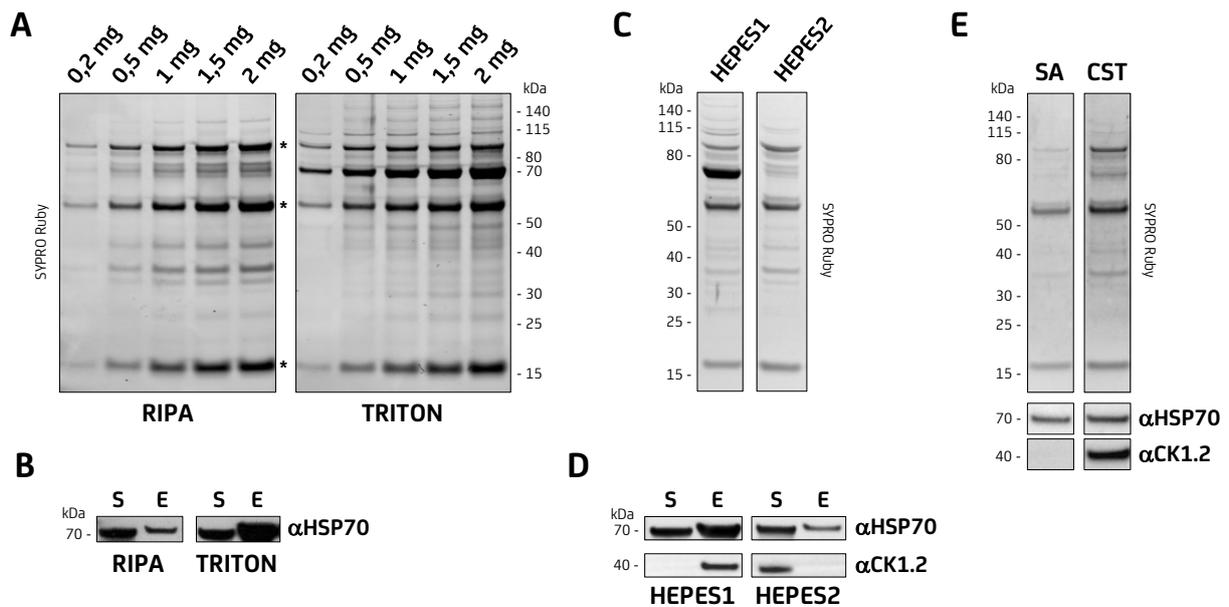


Figure 25. Détermination des conditions de lyse et de la limite de saturation de l'ATP-Agarose

(A) Cinq quantités différentes d'extraits totaux de protéines d'amastigotes axéniques obtenus avec un tampon de lyse TRITON ou RIPA ont été soumises à une chromatographie d'affinité à l'ATP sur un mélange des 4 ATP-Agaroses. Les éluions ont été résolues par SDS-PAGE et soumises à une coloration SYPRO Ruby. **(B)** Les éluions (E) et les surnageant (S) de la condition 1,5 mg, obtenus en (A), ont été résolus par SDS-PAGE et analysés par Western blot anti-HSP70. **(C)** Des extraits totaux de protéines d'amastigotes axéniques obtenus avec un tampon de lyse HEPES1 ou HEPES2 ont été soumis à une chromatographie d'affinité à l'ATP sur un mélange des 4 ATP-Agaroses. Les éluions ont été soumis à une SDS-PAGE, puis une coloration SYPRO Ruby. **(D)** Les éluion (E) et les surnageants (S), obtenus en (C), ont été soumis à une SDS-PAGE et analysés par Western Blot anti-HSP70 et -CK1.2. **(E)** 1 mg d'extraits totaux de protéines d'amastigotes axéniques obtenus avec un tampon de lyse RIPA Sigma-Aldrich (SA) ou Cell Signaling Technology (CST) ont été soumis à une chromatographie d'affinité à l'ATP sur un mélange des 4 ATP-Agaroses. Les éluions ont été résolues par SDS-PAGE, puis soumises à une coloration SYPRO Ruby, ou une analyse par Western blot anti-HSP70.

différentes de protéines totales (0,2 mg, 0,5 mg, 1 mg, 1,5 mg et 2 mg) pour les deux conditions de lyse. Ensuite, j'ai effectué les purifications mais en modifiant certaines conditions du protocole (Matériel & méthodes II.2.9). Pour cette expérience, j'ai doublé la quantité d'ATP-Agarose** utilisée (100 µl au lieu de 50 µl) et ajusté proportionnellement tous les volumes de tampons utilisés. De plus, l'incubation de l'extrait total avec l'ATP-Agarose a été réalisée pendant 3 h au lieu de 2h30, et la dernière élution a été incubée pendant la nuit au lieu de 30 min. Au final, les trois éluions obtenues pour chaque condition ont été réunies et concentrées dans un volume final de 100 µl avec des filtres Amicon Ultra 10K (Millipore). Ensuite, 20 µl de chaque élution ont été soumis à une SDS-PAGE, puis une coloration SYPRO Ruby (Matériel & méthodes II.2.3 & II.2.5) (Figure 25A).

Tout d'abord, les résultats obtenus avec le tampon de lyse TRITON, valident l'utilisation des 4 ATP-Agaroses dans un même Essai étant donné que la totalité des signaux précédemment observés dans les éluions de chaque ATP-Agarose sont visibles et regroupés sur un même profil (Figures 22A & 23B). Ensuite, les résultats obtenus avec le tampon de lyse TRITON semblent indiquer que la quantité de protéines capturées dans les éluions est proportionnelle à la quantité de protéines totales utilisée pour la purification. En effet, la quantité de protéines capturées augmente proportionnellement à la quantité de protéines totales jusqu'à 2 mg. Par contre, cela n'est pas le cas pour la condition RIPA, car la quantité de protéines capturées augmente proportionnellement jusqu'à 1 mg, mais reste similaire entre 1 et 2 mg, excepté pour les protéines majoritaires (*). Donc, il semblerait que la limite de saturation de l'ATP-Agarose ne soit pas atteinte pour les deux conditions mais que pour la condition RIPA, 1 mg de protéines totales soit suffisant pour permettre la capture de la quasi-totalité des protéines de liaison à l'ATP sans saturer l'élution avec les protéines très abondantes.

Ensuite, la comparaison entre les deux tampons de lyse révèle la présence d'un certain nombre de protéines entre 30 et 50 kDa dans la condition RIPA qui sont inexistantes ou à peine visibles dans la condition TRITON. Ces protéines pourraient être des kinases étant donné que nombre d'entre elles ont un poids moléculaire dans cet intervalle. D'autre part, la protéine avec un signal très intense à 70 kDa dans la

condition TRITON semble disparaître ou être en quantité considérablement réduite dans la condition RIPA. Étant donné les résultats obtenus précédemment, il est très probable que cette protéine soit la protéine de choc thermique HSP70. En effet, lors des expériences précédentes, j'ai démontré que HSP70 était présente dans mes éluions (Figure 22B), mais également très abondante, puisque 3 iso-formes de cette protéine ont été retrouvées parmi les 5 protéines les plus abondantes lors de l'analyse MS. Je peux donc supposer que l'utilisation du tampon de lyse RIPA permet de diminuer la quantité de HSP70 capturée au profit d'autres protéines comme les kinases.

J'ai testé cette hypothèse par la réalisation d'un Western blot anti-HSP70 avec les éluions (E) et les surnageants (S) obtenus avec la condition utilisant 1,5 mg d'extrait total pour chacun des tampons de lyse (Figure 25B). Les résultats révèlent la présence de HSP70 dans le surnageant (S) et l'élution (E) de chacun des tampons de lyse. Toutefois, la quantité de HSP70 présente dans l'élution RIPA est très largement inférieure à celle présente dans l'élution TRITON. Je peux donc en conclure que la quantité de HSP70 capturée est fortement réduite avec l'utilisation du tampon de lyse RIPA comparé au tampon de lyse TRITON. Cette quantité plus faible pourrait être due à une diminution de la quantité de HSP70 capturée de façon indirecte via des protéines partenaires capables de lier l'ATP, ou à une plus grande diversité et/ou quantité de protéines de liaison à l'ATP dans le lysat, qui générerait alors une compétition plus grande pour se fixer à l'ATP-Agarose. Cette dernière hypothèse semble la plus probable car il s'avère que le tampon de lyse RIPA contient du Déoxycholate de Sodium (SDC) connu pour perturber les interactions protéine/protéine et solubiliser les composants cellulaires et membranaires.

2.1.2. Comparatif entre 2 tampons de lyse HEPES avec ou sans Déoxycholate de Sodium

D'après les résultats précédents, le tampon de lyse RIPA semble être le plus prometteur, mais cela pourrait être dû uniquement à la présence du SDC dans le RIPA. Il est donc indispensable de tester ce détergeant dans un autre tampon de lyse. Cela étant, j'ai également décidé de tester une base de tampon différente car le TRIS présent dans le TRITON et le RIPA est connu pour interférer avec l'activité de

** 1/4 AP ATP-Agarose + 1/4 EDA ATP-Agarose + 1/4 6AH ATP-Agarose + 1/4 8AH ATP-Agarose

certaines enzymes. J'ai donc réalisé des extraits totaux à partir d'une culture d'amastigotes axéniques avec des tampons de lyse HEPES1 (1% NP40) et HEPES2 (1% NP40 et 1% SDC) (Tableau III) (Matériel & méthodes II.2.1 & II.2.2). Ensuite, 1,5 mg de chacun de ces extraits ont été soumis à une chromatographie d'affinité à l'ATP comme décrit précédemment. Les éluions concentrées ont été soumises à une SDS-PAGE et une coloration SYPRO Ruby (Matériel & méthodes II.2.3 & II.2.5) (Figure 25C). Le profil général des protéines capturées avec les tampons de lyse HEPES1 et HEPES2 semblent très similaires à ceux obtenus avec le TRITON et le RIPA respectivement. De nouveaux, la présence de SDC dans le tampon de lyse permet de réduire fortement la quantité de protéine(s) présente(s) à 70 kDa.

Afin de déterminer s'il s'agit bien d'une diminution de HSP70 capturée, j'ai réalisé un Western blot anti-HSP70 en utilisant 25 µl d'éluion (E) et 15 µl de surnageant (S) (Figure 25D). Comme observé précédemment sur la figure 25B, je constate une forte diminution de la quantité de HSP70 capturée en présence de SDC dans le tampon de lyse. Ensuite, afin de voir si l'utilisation de l'HEPES à la place du TRIS permet d'améliorer la capture des kinases, j'ai régénéré la membrane PVDF et réalisé un Western blot avec un anticorps anti-CK1.2 (Matériel & méthodes II.2.6 ; Tableau IV) (Figure 25D). Les résultats obtenus montrent la présence de CK1.2 uniquement dans l'éluion de la condition HEPES1 et dans le surnageant de la condition HEPES2. Il semblerait donc qu'avec le tampon de lyse HEPES1, l'intégralité de la protéine CK1.2 présente dans l'extrait total soit capturée, puisqu'il n'y a aucun signal dans le surnageant, tandis qu'avec le tampon de lyse HEPES2, l'absence de signal dans l'éluion montre que cette protéine n'a pas du tout été capturée.

Au final, l'utilisation de l'HEPES à la place du TRIS ne semble pas avoir apporté d'améliorations majeures pour la capture des protéines de liaison à l'ATP puisque les profils de coloration SYPRO Ruby sont similaires à ceux obtenus avec le TRITON et le RIPA. Il semblerait même qu'il y ait moins de protéines présentes dans les éluions puisque l'intensité des signaux est plus faible alors que le volume d'éluion déposé sur gel est plus grand. Ensuite, ces résultats me permettent également de confirmer que la présence de SDC dans le tampon de lyse influe sur la

quantité de HSP70 capturée. Cependant, l'absence de CK1.2 dans l'éluion obtenue avec le tampon de lyse HEPES2 laisse supposer que la combinaison de l'HEPES avec le SDC, ou le SDC uniquement, n'est pas favorable à la capture des kinases. Toutefois, un réplicat technique permettrait de valider définitivement le résultat et d'écarter toute possibilité d'erreur technique.

2.1.3. Comparatif entre 2 tampons de lyse RIPA

Etant donné les résultats précédemment obtenus, le tampon de lyse RIPA semble donc être le plus adapté à nos besoins. Toutefois, n'ayant pas contrôlé la présence de CK1.2 dans les éluions obtenues avec le RIPA, il est indispensable de réaliser cette expérience avant de pouvoir conclure. Par ailleurs, j'ai également décidé de tester un autre tampon de lyse RIPA provenant d'un fournisseur différent avant de valider définitivement ce tampon de lyse. Dans ce but, j'ai réalisé des extraits totaux à partir d'une culture d'amastigotes axéniques avec les tampons de lyse RIPA CST (Cell Signaling Technology) et RIPA SA (Sigma Aldrich) (Matériel & méthodes II.2.1) (Tableau III). La particularité du tampon de lyse RIPA SA est qu'il contient 0,1% SDS, 0,5% SDC et 1% NP40, alors que le RIPA CST ne contient pas de SDS, mais 1% SDC et 1% NP40. Ensuite, j'ai réalisé des chromatographies d'affinité à l'ATP, comme décrit précédemment, à partir de 1 mg de chaque extrait total. Puis, 20 µl de l'éluion de chaque condition ont été soumis à une SDS-PAGE. Une coloration SYPRO Ruby, ou des analyses de Western Blot anti-HSP70 et -CK1.2 ont ensuite été réalisées (Matériel & méthodes II.2.3, II.2.5 & II.2.6 ; Tableau IV) (Figure 25E).

Les profils obtenus avec la coloration SYPRO Ruby sont similaires pour les deux conditions, mais la quantité de protéines capturées avec le RIPA SA est beaucoup plus faible. L'analyse des Western blots montre qu'il y a un signal similaire pour HSP70 dans les deux conditions malgré le fait que la quantité de protéines capturées avec le RIPA SA soit plus faible. Cependant, CK1.2 a été capturée uniquement avec le tampon de lyse RIPA CST. Donc, les résultats suggèrent que la diminution du pourcentage de SDC dans le tampon de lyse RIPA favorise la capture de HSP70. D'autre part, il est curieux de constater l'absence de CK1.2 dans l'éluion du RIPA SA puisqu'elle est présente dans celle du tampon RIPA CST. Toutefois, cela pourrait s'expliquer par la

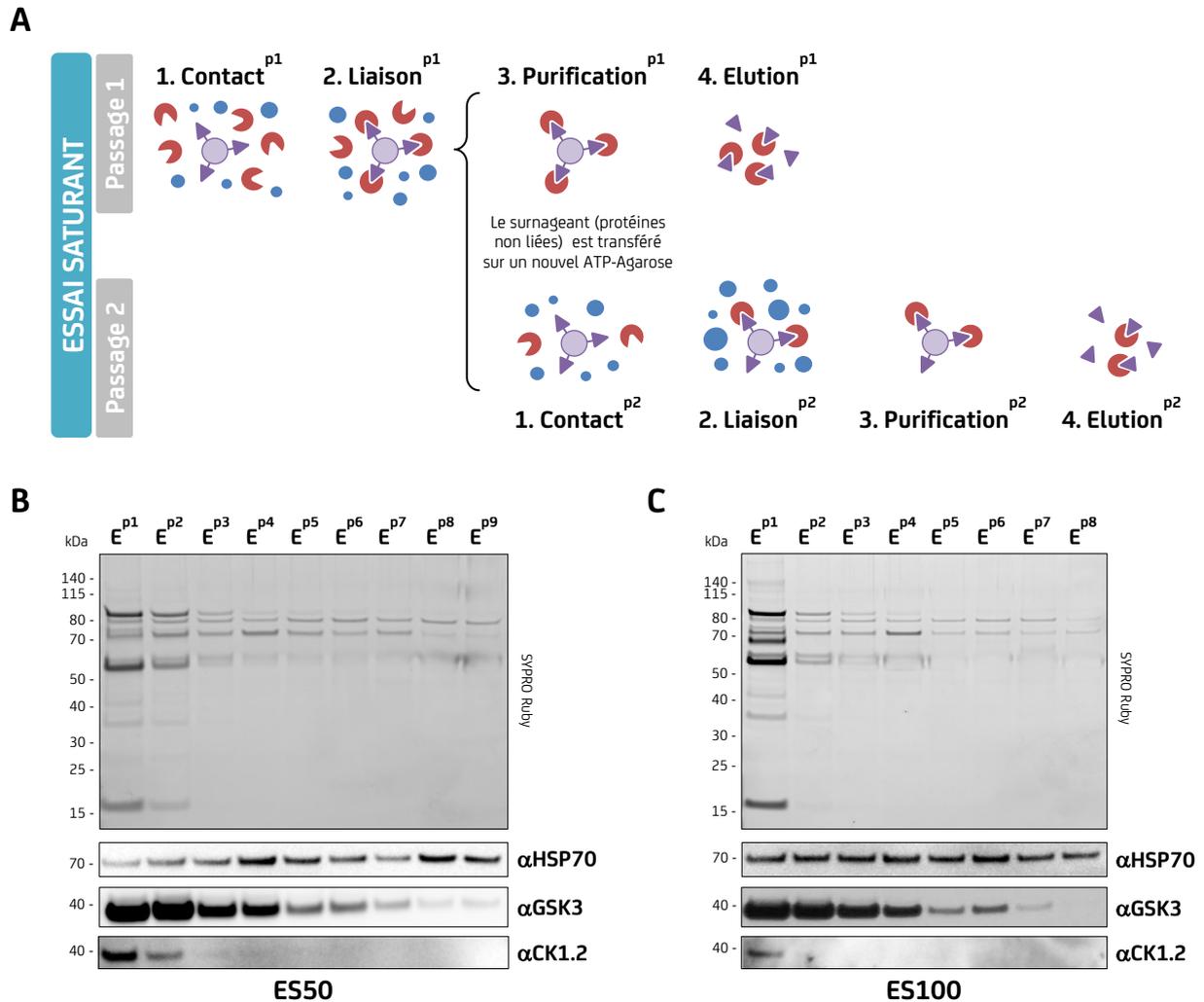


Figure 26. Optimisations de la chromatographie d'affinité à l'ATP successive

(A) Représentation schématique de la chromatographie d'affinité à l'ATP successive : Essai saturant. (B) Un extrait total de protéines d'amastigotes axéniques a été soumis à un Essai Saturant de 9 passages avec 50 μ l d'ATP-Agaroses (ES 50). Les éluions (E^p) ont été résolues par SDS-PAGE et soumises à une coloration SYPRO Ruby, ou à des analyses de Western Blot anti-HSP70, -GSK3 et -CK1.2. (C) Un extrait total de protéines d'amastigotes axéniques a été soumis à un Essai Saturant de 8 passages avec 100 μ l d'ATP-Agaroses (ES 100). Les éluions (E^p) ont été résolues par SDS-PAGE et soumises à une coloration SYPRO Ruby, ou à des analyses de Western Blot anti-HSP70, -GSK3 et -CK1.2.

présence de Dodécylsulfate de Sodium (SDS) dans le RIPA SA. En effet, il est fort probable que cet agent dénaturant qui supprime les liaisons non-covalentes des protéines, ait influé sur la conformation de CK1.2 en lui faisant perdre toute possibilité de lier l'ATP. De plus, cela pourrait également expliquer la plus faible quantité de protéines capturées avec le RIPA SA.

2.1.4. Conclusion

L'ensemble des résultats obtenus, lors de cette détermination des conditions optimales de lyse, ont révélé que le SDC était le meilleur détergeant pour capturer CK1.2 mais également HSP70 sans pour autant saturer les ATP-Agaroses au détriment d'autres protéines (entre 30 et 50 kDa) comme cela a été le cas lors de l'analyse MS (Résultats II.1.5). Toutefois, la présence de ce détergeant seul ne semble pas suffisante pour permettre la capture de CK1.2 (Figure 25D), et il semblerait que la présence de TRIS dans le tampon de lyse soit nécessaire pour capturer CK1.2. Donc pour conclure, les conditions optimales de la chromatographie d'affinité à l'ATP sont les suivantes : 1 mg d'extrait total de protéines obtenu par lyse dans un tampon RIPA CST pour un volume de 100 µl des 4 ATP-Agaroses (25 µl AP-ATP, 25 µl EDA-ATP, 25 µl 6AH-ATP, 25 µl 8AH-ATP) avec une incubation de la dernière élution pendant la nuit.

2.2. Chromatographies d'affinité à l'ATP successives

La chromatographie d'affinité à l'ATP ayant été optimisée il aurait été logique de procéder à une nouvelle analyse MS de mes éluions et d'identifier les protéines présentes dans mon ATPome. Toutefois, les analyse MS étant particulièrement onéreuses, il était indispensable de valider que l'intégralité des protéines de liaisons à l'ATP disponibles dans mon extrait de protéines totales étaient capturées. Afin d'obtenir l'ATPome le plus complet possible, il a fallu utiliser une approche qui permette la capture d'un maximum de protéines de liaisons à l'ATP, et plus particulièrement celles faiblement abondantes ou ayant une affinité plus faible pour l'ATP. Pour cela, j'ai décidé de réaliser plusieurs chromatographies d'affinité successives : Essai saturant (Figure 26A). Dans cette méthode, l'extrait total de protéines est mis en contact avec l'ATP-Agarose comme décrit précédemment, puis le surnageant obtenu après purification est à nouveau mis en contact avec un

nouvel aliquote d'ATP-Agarose pour une seconde purification. Le processus est ensuite répété une dizaine de fois jusqu'à épuisement total des protéines capables de lier l'ATP. Ainsi, en utilisant cette méthode, je devrais obtenir l'ATPome le plus complet possible.

J'ai donc réalisé deux chromatographies d'affinité successives avec 1 mg d'extrait total de protéines d'amastigotes axéniques (RIPA CST), en utilisant deux volumes d'ATP-Agarose afin de déterminer celui qui serait le plus efficace : un Essai saturant de 9 passages sur 50 µl d'ATP-Agarose (ES50) et un Essai saturant de 8 passages sur 100 µl d'ATP-Agarose (ES100). L'étape d'incubation avec l'ATP-Agarose a été réalisée pendant 2 h pour les passages 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9 et pendant la nuit pour les passages 4 et 8. Les 3 éluions de chaque passage ont été concentrées dans un volume final de 100 µl (E^0), puis 30 µl ont été soumis à une SDS-PAGE et une coloration SYPRO Ruby (Matériel & méthodes II.2.3 & II.2.5) (Figures 26B & 26C).

Le profil général des protéines capturées ne présentent pas de différences significatives entre les deux volumes d'ATP-Agarose utilisés, excepté lors des premiers passages. En effet, la quantité de protéines capturées dans l'élution du passage 1 (E^{P1}) pour ES100 correspond sensiblement à l'addition des quantités de protéines présentes dans les éluions des passages 1 et 2 (E^{P1} , E^{P2}) pour ES50. Ce qui coïncide parfaitement avec les volumes d'ATP-Agarose utilisés. Ensuite, pour les éluions au-delà du passage 4 (E^{P4}) la quantité de protéines capturées dans les éluions reste similaire, mais il est fort probable que la limite de détection de la coloration SYPRO Ruby ne permette pas de visualiser les différences. Ces résultats démontrent clairement qu'un seul passage n'est absolument pas suffisant pour capturer l'intégralité des protéines de liaison à l'ATP à partir d'un extrait initial de 1 mg.

Ensuite, afin de visualiser la quantité de HSP70, CK1.2 et GSK3 (Glycogène synthase kinase 3) capturée dans les éluions au cours des passages, j'ai réalisé des Western Blots sur 30 µl des éluions de chaque passage en utilisant des anticorps anti-HSP70, -GSK3 et -CK1.2 (Matériel & méthodes II.2.3 & II.2.6 ; Tableau IV). Les résultats obtenus montrent que la quantité de HSP70 capturée reste sensiblement identique au fur et à mesure des passages pour ES100, alors que pour ES50, la quantité est faible lors des trois premiers passages

puis augmente et fluctue légèrement au cours des passages suivants. Il semblerait donc que les 8 ou 9 passages successifs ne soient pas suffisants pour capturer l'intégralité de HSP70 tellement celle-ci est abondante dans l'extrait total. Pour la protéine GSK3, j'observe un signal très fort qui diminue lentement au cours des 4 premiers passages jusqu'à une disparition totale dans l'élution du dernier passage pour ES50 et ES100. Ces résultats indiquent nettement que les deux approches sont capables de capturer l'intégralité de la protéine GSK3 présente dans l'extrait total de départ. Et pour finir, je remarque que la totalité de la protéine CK1.2 a été capturée dans les passages 1 (E^{p1}) et 2 (E^{p2}) pour ES50 et dans le passage 1 (E^{p1}) pour ES100. Cependant, il est curieux de constater que la quantité de CK1.2 capturée dans E^{p1} /ES100 est beaucoup plus faible que celle capturée dans E^{p1} /ES50 et correspond plutôt à celle capturée dans E^{p2} /ES50. En effet, étant donné que le volume d'ATP-Agarose est plus grand pour ES100, il aurait été normal d'observer une plus grande quantité de CK1.2 capturée par cette méthode. Toutefois, n'ayant pas réalisé de Western blot contrôle sur le surnageant final, il m'est impossible de déterminer si ce résultat est dû à une moins bonne capture de CK1.2 dans ES100 ou à un problème technique lors du Western blot.

Pour conclure, il semblerait que l'utilisation de 50 μ l d'ATP-Agarose pour la purification soit plus efficace lors des trois premiers passages avec moins de HSP70 capturée et plus des kinases capturées. Cela pourrait indiquer que dans cette méthode, l'ATP-Agarose capture préférentiellement les protéines ayant une bonne affinité pour l'ATP, puis lors des passages suivants, lorsque l'intégralité de celles-ci a été capturée, les protéines avec une affinité plus faible ou encore présentes en raison de leur grande abondance (HSP70) sont à leur tour capturées. Toutefois, à défaut de pouvoir tester l'intégralité des kinases, HSPs ou autres protéines de liaison à l'ATP par Western blot, je ne peux émettre que des suppositions. Donc afin de trouver un compromis entre les deux méthodes, j'ai décidé d'utiliser 50 μ l d'ATP-Agarose pour les trois premiers passages puis 100 μ l pour les passages suivants.

3. Enrichissement et analyse de l'ATPome de *Leishmania donovani*

3.1. Enrichissement de l'ATPome

La procédure d'enrichissement de l'ATPome ayant été mise au point, j'ai appliqué la chromatographie d'affinité successive sur un extrait total de protéines d'amastigotes axéniques. Un milligramme de cet extrait (Ama 1) a été soumis à un Essai saturant de 8 passages utilisant 50 μ l d'ATP-Agarose pour les trois premiers passages et 100 μ l pour les cinq suivants. Afin de réduire les coûts de l'analyse MS, les trois éluions obtenues pour chaque passage ont été réunies et concentrées dans un volume final de 100 μ l de la façon suivante :

- E^{p1} > éluions passage 1
- E^{p2-3} > éluions passages 2 et 3
- E^{p4-8} > éluions passages 4, 5, 6, 7 et 8

Avant d'analyser ces éluions, j'ai réalisé plusieurs contrôles pour valider la qualité de l'ATPome. Le premier contrôle est une estimation de la quantité

de HSP70, GSK3 et CK1.2 présente dans mes éluions. Pour cela, j'ai réalisé des Western blot à partir de 20 μ l des éluions réunies (E^p), 12 μ l de surnageant (S) et 3 μ l d'extrait total (T). De plus, afin de contrôler la quantité de protéines déposée, la membrane a été colorée au bleu de Coomassie (Matériel & méthodes II.2.3 & II.2.6 ; Tableau IV) (Figure 27A). D'autre part, pour l'analyse des résultats suivants, il faut tenir compte du fait que la quantité de protéines dans E^{p1} correspond à l'élution du passage 1 uniquement, alors que celles présentes dans E^{p2-3} et E^{p4-8} sont respectivement les sommes des éluions des passages 2 et 3, et 4 à 8.

Les résultats obtenus pour les Western blots montrent un signal de même intensité dans E^{p1} et E^{p2-3} pour les trois protéines testées, alors que dans E^{p4-8} , le signal est un peu plus faible pour HSP70, très faible pour GSK3 et quasi-nul pour CK1.2. Donc, l'ensemble de ces résultats suggèrent que la

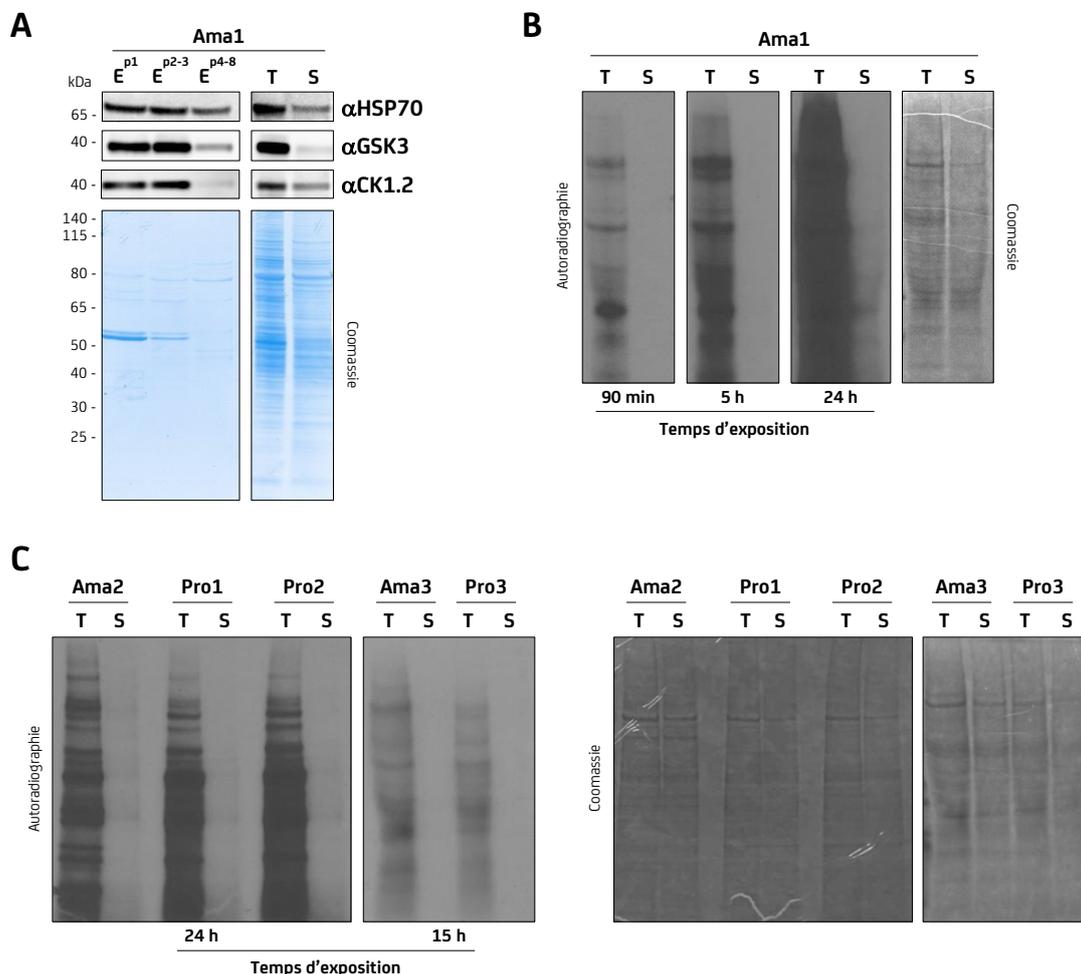


Figure 27. Enrichissement de l'ATPome par chromatographie d'affinité à l'ATP successive

(A) Un extrait total de protéines d'amastigotes axéniques (Ama 1) a été soumis à une chromatographie d'affinité à l'ATP successive (3 passages avec 50 µl d'ATP-Agaroses puis 5 passages avec 100 µl d'ATP-Agaroses), puis les éluions ont été réunies (passage 1 > E^{p1}, passages 2 et 3 > E^{p2-3}, passages 4, 5, 6, 7 et 8 > E^{p4-8}). Les éluions (E^p), l'extrait total (T) et le surnageant (S) ont été résolus par SDS-PAGE et soumis à des analyse de Western Blot anti-HSP70, -GSK3 et -CK1.2. Ensuite, la membrane a été colorée au bleu de Coomassie. **(B)** L'extrait total de protéine (T) et le surnageant (S), obtenu en (A), ont été soumis à un « *in vitro* Kinase Assay », puis résolus par SDS-PAGE et soumis à une coloration au bleu de Coomassie. **(C)** Des extraits totaux de protéines issus de 3 réplicats biologiques de promastigotes (Pro 1, 2 & 3) et 2 réplicats biologiques d'amastigotes axéniques (Ama 2 & 3) ont été soumis à une chromatographie d'affinité à l'ATP successive avec 8 passages comme décrit précédemment. Les extraits totaux (T) et les surnageants (S) ont été soumis à un « *in vitro* Kinase Assay », puis résolus par SDS-PAGE et soumis à une coloration au bleu de Coomassie.

méthode a permis de capturer la quasi-totalité de HSP70, GSK3 et CK1.2 puisqu'il ne reste presque plus de ces protéines présentes dans E^{p4-8}. Cependant, je remarque qu'il y a toujours un signal pour ces protéines dans le surnageant final (S), bien qu'il soit beaucoup plus faible que pour l'extrait total (T). De plus, si je rapporte l'intensité du signal à la quantité de protéines déposée (bleu de Coomassie), je constate qu'il reste toujours une quantité non négligeable de ces protéines dans le surnageant. Toutefois, étant donné que la quantité de protéines présentes dans E^{p4-8} (somme des cinq dernières éluions) diminue fortement, je peux supposer que la quantité de HSP70, GSK3 et CK1.2 restante dans le surnageant n'est probablement pas capable de lier l'ATP (complexes protéiques, inactives).

Afin de m'assurer que j'ai capturé l'intégralité des protéines de liaison capables de lier l'ATP, et plus particulièrement les kinases, dans mon extrait protéique de départ, j'ai décidé d'utiliser un contrôle supplémentaire pour visualiser s'il reste des protéines capables de fixer l'ATP dans mon surnageant final. A cet effet, j'ai utilisé un test d'activité kinase *in vitro* (IVKA) pour révéler l'activité phosphotransférases* et/ou l'autophosphorylation** des protéines d'un échantillon pour un substrat donné en utilisant un ATP radiomarqué. Dans ce test, je n'utilise pas de substrat additionnel, mais je considère que toutes les protéines peuvent potentiellement interagir avec leurs substrats étant donné qu'elles sont toutes solubilisées dans un même échantillon.

Brièvement, 3 µl d'extrait total de protéines (après dialyse) (T) et 12 µl de surnageant (S) ont été soumis à un IVKA (Matériel & méthodes II.2.11) (Figure 27B). Les profils obtenus pour la coloration au bleu de Coomassie montrent que la quantité de protéines présentes dans le surnageant (S) est légèrement inférieure à celle présente dans l'extrait total (T). Les résultats du IVKA, révèlent, quant à eux, une grande quantité de signaux dans les protéines totales (T) indiquant qu'un grand nombre de protéines ont été capables d'utiliser l'ATP radiomarqué pour phosphoryler leur(s) substrat(s). Par contre, pour le surnageant (S), je constate une absence totale de signaux après 90 min et 5 h d'exposition du film radiographique sur le gel, indiquant qu'il n'y a plus de protéines ayant une activité phosphotransférase ou capables de s'autophosphoryler dans le surnageant. Afin de valider ce résultat le film a été surexposé

pendant 24 h, et cette fois-ci, j'observe enfin des signaux à peine visibles pour le surnageant alors que ceux pour l'extrait total sont totalement saturés. J'en conclus donc qu'il ne reste plus de protéines capables de fixer et/ou utiliser l'ATP dans le surnageant, indiquant que l'intégralité des protéines de liaison à l'ATP fonctionnelles et disponibles dans mon extrait protéique de départ ont été capturées.

La procédure d'enrichissement ayant été validée, j'ai pu enrichir les ATPomes des promastigotes et des amastigotes axéniques de *L. donovani*. Trois réplicats biologiques d'extraits totaux de protéines de promastigotes (Pro 1, 2 & 3) et deux réplicats biologiques d'extraits totaux de protéines d'amastigotes (Ama 2 & 3) ont été soumis à une chromatographie d'affinité à l'ATP successive comme décrit précédemment (Résultats II.3.1). En parallèle, un IVKA a été réalisé sur tous les surnageants en guise de contrôle (Matériel & méthodes II.2.11) (Figure 27C). Comme précédemment observé pour Ama 1, les résultats obtenus pour chaque réplikat biologique révèlent une grande quantité de signaux pour les extraits totaux (T), mais aucun signal pour les surnageants (S). Ces résultats démontrent encore une fois la reproductibilité de la méthode. Finalement, les éluions obtenues pour tous les réplicats biologiques (Ama 1, 2 & 3 ; Pro 1, 2 & 3) ont été conservées pour une analyse MS ultérieure.

3.2. Protéome de *L. donovani* LD1S

Préalablement à l'analyse MS des ATPomes promastigote et amastigote, nous avons décidé, avec mes collaborateurs du Laboratoire de Spectrométrie de Masse Protéomique de l'Institut Curie, de réaliser le protéome de notre souche de *L. donovani* afin d'établir la limite de détection de la GelC-MS/MS et de générer une base de données pour faciliter l'identification des peptides des protéines présentes dans les éluions. Cela est absolument nécessaire pour accroître la possibilité d'identification des protéines faiblement abondantes, et nous fournira notamment le répertoire complet des protéines exprimées dans les stades promastigote et amastigote de la souche LD1S de *L. donovani*.

A cet effet, j'ai réalisé trois réplicats biologiques d'extraits totaux de protéines de promastigotes et d'amastigotes axéniques, avec un tampon de lyse RIPA CST (Matériel & méthodes II.2.1 & II.2.2), qui ont ensuite été analysés par spectrométrie de masse à

* transfert d'un groupement phosphate sur un résidu sérine, thréonine ou tyrosine par hydrolyse de l'ATP ou du GTP.

** réactions de phosphorylation dans laquelle la protéine est son propre substrat.

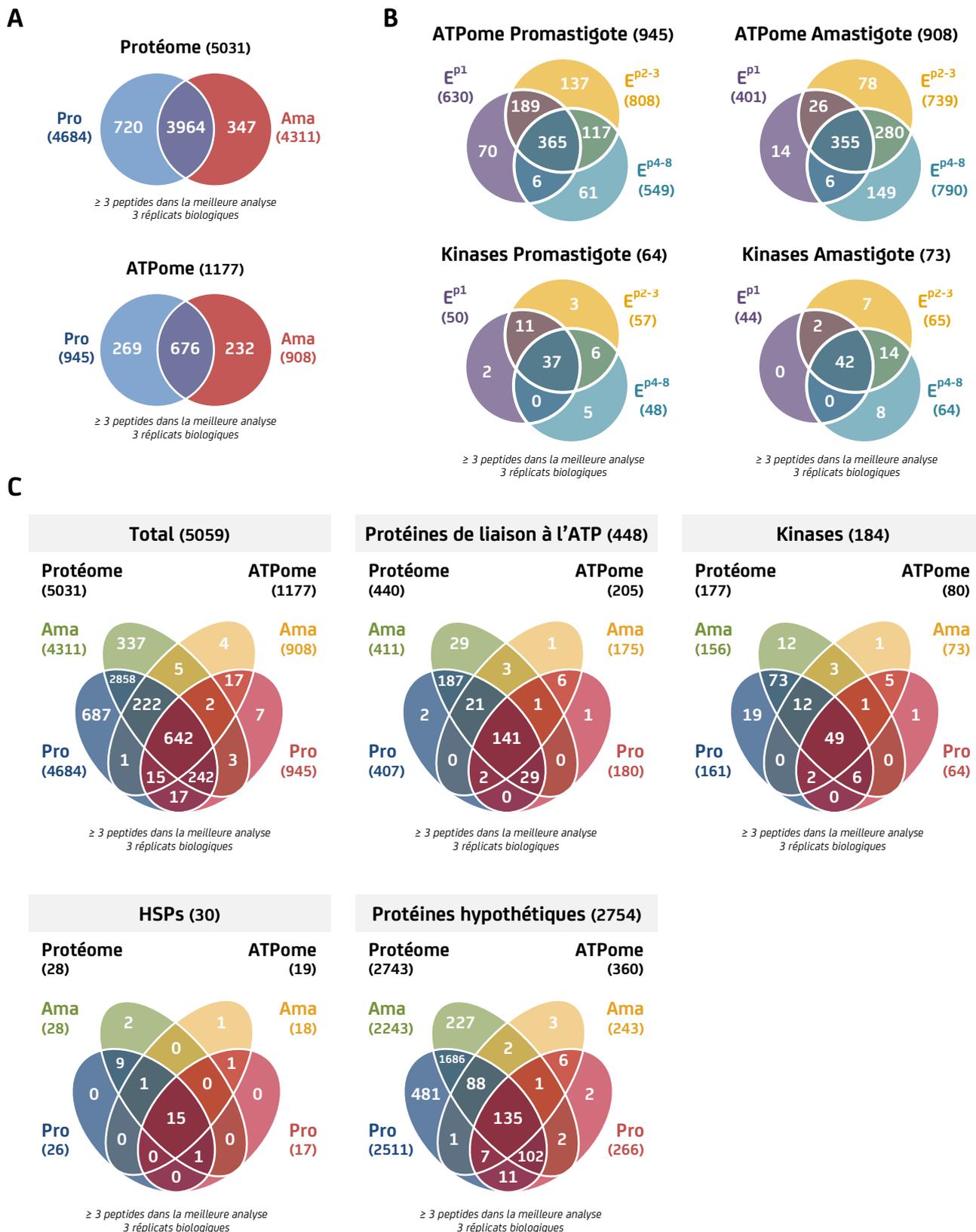


Figure 28. Analyse comparative des protéines identifiées dans l'ATPome et le protéome

Les éluions obtenues dans la Figure 27 ont été analysées en MS. **(A)** Diagrammes de Venn du nombre de protéines identifiées dans le protéome et l'ATPome en promastigotes et amastigotes axéniques. **(B)** Diagrammes de Venn du nombre de protéines totales et kinases identifiées dans chaque passage. **(C)** Un protéome a été réalisé dans les mêmes conditions de lyse que l'ATPome et analysé par MS. Diagrammes de Venn comparatifs du nombre de protéines identifiées dans le protéome et l'ATPome pour les stades deux stades du parasite.

raison de 10 analyses pour chaque réplicat biologique. Les données ont été analysées avec le logiciel myProMS sur la base de données TriTrypDB de *L. infantum* JPCM5. Cette analyse a permis d'identifier 6352 protéines (≥ 1 peptide dans la meilleure analyse) sur les 8381 gènes référencés pour *L. infantum* JPCM5, générant ainsi le protéome le plus complet jamais réalisé chez *Leishmania* (Drummelsmith et al., 2003; El Fakhry et al., 2002; Rosenzweig et al., 2008). Toutefois, sur recommandation de mes collaborateurs du laboratoire de Spectrométrie de Masse Protéomique de l'Institut Curie, je n'ai conservé que les protéines dont 3 peptides différents ont pu être identifiés dans au moins une analyse (≥ 3 peptides dans la meilleure analyse) afin de valider la présence de ces protéines. Après cet ajustement, le nombre de protéines identifiées dans le protéome de la souche *L. donovani* LD15 est de 5031 protéines qui correspondent à 60% du génome de *L. infantum*, et reste toujours le meilleur protéome jamais réalisé (Figure 28A). Parmi ces protéines, 4684 protéines ont été identifiées dans les promastigotes, dont 720 protéines spécifiques à ce stade, et 4311 protéines dans les amastigotes axéniques, dont 347 protéines spécifiques à ce stade.

En ce qui concerne les 40% de protéines qui n'ont pu être identifiées dans cette analyse, cela peut être dû, soit à la limite de détection de la spectrométrie de masse (protéines trop faiblement abondantes), soit parce qu'elles ne sont pas présentes dans mes extraits totaux de protéines analysés (non produites ou non extraites). Cette analyse a également permis l'identification de 440 protéines de liaison à l'ATP sur les 535 protéines annotées sur TriTrypDB, mais aussi 146 kinases sur les 288 référencées chez *L. infantum*. J'ai également identifié 31 kinases supplémentaires qui ne sont pas annotées pour cette fonction dans les bases de données de TriTrypDB. Donc au total, cette analyse a permis d'identifier 177 kinases, dont 161 présentes dans les promastigotes, avec 19 spécifiques, et 156 présentes dans les amastigotes axéniques, avec 12 spécifiques (Figure 28C).

Pour conclure, l'établissement de ce protéome m'a permis de créer une base solide pour identifier, analyser et comparer les protéines présentes dans l'ATPome. Mais surtout, ce protéome nous fournit le répertoire de protéines exprimées le plus complet jamais identifié chez *Leishmania* par protéomique, avec près de 60% du génome de *L. infantum*. Cependant, il faut noter que ce nombre est sous-

estimé car chez *Leishmania*, certains gènes, tels que ceux codant pour les HSPs, sont organisés en tandem dont chaque copie code pour une même protéine, générant ainsi un nombre de gènes supérieur au nombre de protéines exprimées (Rogers et al., 2011).

3.3. Analyse de l'ATPome

Le protéome ayant été établi et toutes les expériences ayant été contrôlées, pour les 3 réplicats biologiques promastigote et amastigote axénique, toutes les éluions (ATPome) ont été analysées en spectrométrie de masse (GeLC-MS/MS). Les données ont été traitées avec le logiciel myProMS en utilisant la base de données TriTrypDB de *L. infantum* JPCM5. Cette analyse a permis d'identifier 1177 protéines, dont 945 dans les promastigotes et 908 dans les amastigotes axéniques (Figure 28A). Contrairement aux résultats obtenus avec le protéome, il n'y a pas de différence majeure entre le nombre de protéines identifiées dans chaque stade. Afin de visualiser si les passages successifs sur les ATP-Agaroses ont réellement améliorés le nombre de protéines capturées, j'ai réalisé des Diagrammes de Venn comparant le nombre de protéines identifiées au cours de chaque passage (E_{p1} > éluion passage 1, E_{p2-3} > éluions passages 2 et 3 et E_{p4-8} > éluions passages 4 à 8) (Figure 28B). Cette analyse montre que de nombreuses protéines ont été uniquement capturées dans les passages 2-3 et 4 à 8 avec une augmentation du nombre de protéines identifiées pour ces passages (2 à 8) de 50% en promastigotes et de 126,4% en amastigotes par rapport au passage 1. De plus, si je compare le nombre de kinases identifiées dans les différents passages, je constate que les passages successifs ont permis une augmentation de près de 27,5% en promastigotes et de 64,4% en amastigotes par rapport au passage 1. Je peux donc encore une fois valider la stratégie des passages successifs et affirmer que la chromatographie d'affinité à l'ATP successive permet donc de capturer les protéines faiblement abondantes ou ayant une capacité de liaison à l'ATP moins efficace.

Ensuite, j'ai comparé les protéines identifiées dans l'ATPome et le protéome pour les deux stades du parasite avec le logiciel MyProMS et représenté les résultats dans des diagrammes de Venn (Figure 28C). En comparant l'ATPome avec le protéome pour l'ensemble des protéines identifiées (Total), je remarque que l'ATPome

représente près de 23% du protéome (1149 protéines sur 5031). De plus, j'ai également identifié 28 protéines supplémentaires qui n'ont pas été identifiées dans le protéome : 7 kinases, 2 HSPs, 11 protéines hypothétiques et 8 protéines non annotées comme liant l'ATP (GO : 0005524). Sur les huit protéines non annotées, trois sont finalement capables de lier l'ATP (glutathionylspermidine synthase et 2 propionyl-CoA carboxylase beta chain), deux de lier le groupement phosphate (phosphotransferase et glycerolphosphate mutase) et une l'adénine (DNA photolyase). Parmi les 11 protéines hypothétiques, j'ai identifié une protéine de liaison à l'ATP déjà annotée comme liant l'ATP mais dont la fonction est inconnue. J'ai ensuite analysé les 10 autres protéines avec le logiciel Protein BLAST (Matériel & Méthode I.4). Cette analyse m'a permis d'identifier 3 protéines avec une fonction ATPase, 1 protéine avec un domaine ATP-Grasp, 2 protéines avec un domaine kinase, 1 protéine avec une fonction GTPase et 2 protéines totalement spécifiques du parasite avec aucun domaine trouvé. Au vu de ces résultats, je peux de nouveau confirmer l'efficacité de la méthode, car j'ai capturé et enrichi 28 protéines, dont 19 qui ont été confirmées comme capables de lier l'ATP, et qui n'ont pas pu être identifiées dans le protéome en raison de leur faible abondance.

Afin de déterminer l'efficacité d'enrichissement de la méthode, j'ai comparé le nombre de protéines identifiées dans l'ATPome et le protéome en réalisant des diagrammes de Venn pour les protéines de liaisons à l'ATP annotées, les kinases, les HSPs et les protéines hypothétiques (Figure 28C). Cette analyse montre que j'ai capturé 205 protéines de liaison à l'ATP annotées dont 197 des 440 identifiées dans le protéome, 80 kinases (73/177) (Annexe 3), 19 HSPs (17/28) et 360 protéines hypothétiques (349/2743). En ne tenant compte que du nombre total de protéines identifiées, cette méthode a permis de capturer 45,8% des protéines de liaison à l'ATP, parmi lesquels 63,3% des HSPs et 43,5% des kinases. Le pourcentage plus faible de kinases obtenu par rapport aux HSPs pourrait être essentiellement dû à l'incapacité des kinases à fixer l'ATP lorsqu'elles sont dans une configuration inactive, mais aussi, à la présence de protéines partenaires qui masquent la poche de liaison à l'ATP (complexe protéique). Cependant, ce nombre de kinases capturées, bien qu'incomplet, me servira de base de comparaison

pour la déconvolution de cibles de nos composés, puisqu'il correspond au maximum de kinases qu'il est techniquement possible de capturer dans l'extrait protéique initial. En effet, j'ai optimisé mes conditions de lyse afin de solubiliser le maximum de protéines possibles tout en conservant leur conformation (Figure 25), et j'ai également prouvé que toutes les protéines de liaison à l'ATP fonctionnelles et présentes dans mon extrait protéique ont été capturées (Figure 27). Concernant les protéines de liaison à l'ATP (comprenant les kinases et les HSPs), cette méthode a permis de capturer 44,8% des protéines identifiées dans le protéome et 38,3% des protéines annotées sur TriTrypDB (205/535). Cependant, les bases de données d'annotation « Gene Ontology » des protéines de *Leishmania* étant nettement incomplètes, il est difficile d'estimer précisément le nombre de protéines de liaison à l'ATP présentes dans l'ATPome, et il y a de fortes chances que ces chiffres soient sous-estimés. En effet, parmi les 972 protéines non annotées comme liant l'ATP, j'ai pu identifier grâce aux informations fournies pour la description des gènes, que 45 protéines étaient capables de lier l'ATP (22 kinases, 8 HSPs, 1 kinésine, 2 protéines de transport d'ATP/ADP, 11 eukaryotic initiation factor ATP-dependent, 1 ATPase de type V).

3.4. Analyses bio-informatiques

Aujourd'hui, l'enjeu principal de cette méthode, développée pour la déconvolution de cible de nos composés, est de déterminer quelles sont les protéines qui ont été capturées via une interaction directe avec l'ATP-Agarose de celles qui ont été co-purifiées via une protéine partenaire capable de lier l'ATP. Il est donc crucial de discriminer ces deux classes de protéines afin de pouvoir valider les cibles de nos composés. A cet effet, j'ai utilisé différents outils bio-informatiques. Parmi les 927 protéines non annotées comme liant l'ATP, 2 groupes de protéines se distinguent : les protéines ayant une fonction connues mais pas de domaine de liaison à l'ATP référencé (567 protéines), et les protéines hypothétiques dont la fonction n'a pas encore été établie (360 protéines). Pour le premier groupe, il est fort probable que la majorité de ces protéines soient co-purifiées via une protéine partenaire capable de lier l'ATP. Toutefois, étant donné le manque d'annotations des protéines dans les bases de données, nous étudions actuellement toutes ces

protéines au cas par cas afin de déterminer si elles sont capables ou non de lier l'ATP. De plus, les ATP-Agaroses ont la caractéristique d'exposer la molécule d'ATP de différentes façons (Figure 21A), de sorte qu'il est fort probable que certaines protéines aient pu se fixer à l'un d'eux via le groupement phosphate, le ribose ou l'adénine. En étudiant plus précisément la liste de ces protéines, j'ai rapidement identifié 144 protéines (3 phosphotransférases, 11 protéines de liaison au NAD/NADH, 4 protéines de liaison au FAD/FADH, 17 phosphatases, 2 protéines de liaison à l'adénine, 13 protéines de liaison au GDP/GTP, 8 protéines de liaison à l'ADP et 86 protéines de liaison à l'ADN/ARN) qui pourraient avoir été capturées via ces groupements. Toutefois, il ne s'agit là que d'une partie de ces protéines qui ont pu être analysées, et pour confirmer cette hypothèse il est indispensable de réaliser des expériences supplémentaires.

A propos des protéines hypothétiques, je remarque tout d'abord qu'elles représentent près de 30% des protéines de l'ATPome. Etant donné que chez *Leishmania*, environ 60% des protéines n'ont pas de fonction clairement établie, il est curieux de ne pas retrouver le même pourcentage dans l'ATPome (Ivens et al., 2005). Il se pourrait donc que ces protéines aient été spécifiquement capturées via un domaine de liaison à l'ATP connu, mais qui n'a pas encore été référencé dans les bases de données, ou alors, via un domaine de liaison à l'ATP spécifique au parasite encore inconnu. Afin de déterminer si ces protéines possèdent un domaine connu, j'ai analysé avec le logiciel Protein BLAST, les 160 protéines hypothétiques ayant été identifiées avec le plus grand nombre de peptides dans l'ATPome. Cette analyse a identifié 59 protéines avec un domaine de liaison à l'ATP ou une fonction ATPase (dont 19 protéines avec un domaine kinase), 2 protéines avec un domaine GTPase, 1 HSP, 73 protéines sans domaine de liaison à l'ATP connu et 25 protéines totalement spécifiques du parasite sans aucun domaine identifié (Annexe 4).

Ensuite, pour les 25 protéines hypothétiques totalement spécifiques du parasite, j'ai analysé leurs séquences protéiques avec le logiciel Phyre2 afin de déterminer si ces protéines possédaient des structures qui pourraient correspondre à des protéines connues (Matériel & Méthode I.4). Cette analyse m'a permis d'identifier 20 protéines avec au moins une structure correspondant à une protéine

capable de lier l'ATP ou avec une fonction ATPase (Annexe 5). Parmi ces protéines, 9 se distinguent des autres car elles possèdent au moins une structure prédite avec une confiance supérieure à 90% (indiquant que ces structures ont une homologie élevée avec le modèle), et/ou un pourcentage d'identité de séquence avec le modèle supérieur à 40%. Bien que Phyre2 ne mesure que la probabilité d'homologie, une confiance et/ou une identité de séquence élevée indique que la protéine a de forte chance de correspondre aux fonctions biologiques des protéines modèles. De plus, si la couverture d'alignement de la structure est élevée, cela augmente encore la probabilité de correspondance de la protéine au modèle. Au final, je n'ai pu valider que la protéine LinJ.31.2340 comme étant une HSPbp1 étant donné qu'elle possède une structure avec 99,1% de confiance qui correspond à 83% de la séquence de cette protéine. Pour les 8 autres protéines validées, il est toutefois fort probable qu'elles soient capables de lier l'ATP, bien que les structures identifiées ne soient pas parfaitement identiques. En effet, il se pourrait que ces protéines possèdent un domaine de liaison à l'ATP dégénéré qui soit spécifique du parasite. Cela pourrait également être le cas des 11 autres protéines identifiées puisqu'au moins huit d'entre elles possèdent une structure avec une confiance >80% et/ou une identité de séquence >30%.

La dernière analyse bio-informatique que j'ai réalisé a pour but de déterminer s'il existe ou non un domaine de liaison à l'ATP inconnu ou dégénéré chez *Leishmania*. Pour cela, j'ai collaboré avec le HUB bio-informatique et bio-statistique de l'Institut Pasteur, afin de rechercher d'éventuels motifs conservés dans les séquences de l'ensemble des protéines identifiées dans l'ATPome. Cette recherche a été réalisée avec le logiciel MEME (Matériel & Méthode I.4) en recherchant des motifs d'une taille comprise entre 6 et 50 acides aminés existants dans au moins 10 protéines. Cette analyse a permis d'identifier 89 motifs correspondant aux critères de recherche avec parfois plus d'une centaine de protéines identifiées par motif. Ces données très récentes, d'une taille plutôt conséquente, sont toujours en cours d'analyse.

3.5. Conclusion

L'ensemble des résultats obtenus a permis dans un premier temps d'établir le répertoire le plus complet

de protéines exprimées chez *Leishmania* par protéomique avec près de 60% du génome de *L. infantum*. Ce protéome me donne également une base solide pour identifier, analyser et comparer les protéines présentes dans mon ATPome. Dans un deuxième temps, les résultats obtenus, lors des tests d'activité kinase *in vitro*, ont montré une absence d'activité phosphotransférase dans les surnageants des trois réplicats biologiques de chaque stade du parasite, indiquant que la grande majorité des protéines responsables de ces activités dans les extraits totaux ont été capturées dans l'ATPome. De plus, l'analyse MS a permis d'identifier 19 protéines capables de lier l'ATP dans l'ATPome qui sont absentes du protéome. Ces résultats me permettent donc de valider cette approche utilisant la chromatographie d'affinité à l'ATP successive pour capturer l'ATPome.

L'analyse MS des ATPomes de promastigotes et d'amastigotes axéniques a révélé que 44,8% des protéines de liaison à l'ATP annotées, parmi lesquelles 60,7% des HSPs et 41,2% des kinases identifiées dans le protéome ont été capturées. Toutefois, le pourcentage de protéines de liaison à l'ATP n'est pas définitif étant donné que les bases de données sont extrêmement mal annotées. Pour pallier à ce problème d'annotation, je suis

actuellement en train de déterminer quelles sont les protéines qui fixent ou non l'ATP parmi les protéines non annotées pour cette fonction. Pour les 578 protéines non hypothétiques, j'effectue une analyse manuelle afin de déterminer si elles se lient ou non à l'ATP. Pour les 360 protéines hypothétiques des analyses bio-informatiques plus poussées sont nécessaires. A ce jour, les analyses bio-informatiques de 160 protéines hypothétiques m'ont permis d'identifier 59 protéines capables de lier l'ATP et 20 autres qui en sont très probablement capables. Toutefois, afin de valider ces résultats, il est indispensable de valider expérimentalement leur capacité de lier l'ATP. Dans ce but, je suis actuellement en train de cloner 20 protéines hypothétiques afin de produire les protéines recombinantes qui seront ensuite validées ou non par chromatographie d'affinité à l'ATP.

Pour conclure, cette méthode a permis de générer le premier ATPome jamais réalisé chez les *Trypanosomatidae*, et bien que la discrimination des protéines qui ont été spécifiquement capturées de celles qui ont été co-purifiées ne soit pas terminée, cette approche nous fournit un outil solide et reproductible pour réaliser la déconvolution de cibles de composés leishmanicides.

4. Détermination de la spécificité des composés issus des criblages

Aujourd'hui, les criblages phénotypiques et ciblés permettent d'identifier un grand nombre de composés actifs qui pourraient tous être exploités pour une déconvolution de cibles ou des études SAR. Le problème majeur qui se pose à la suite de ces criblages est toujours le même : quel composé choisir ? Certains composés peuvent être pléiotropiques en inhibant de multiples cibles (classe A), alors que d'autres, sont plus spécifiques et inhibent uniquement quelques cibles (classe B). L'identification de la cible responsable de l'effet pharmacologique est bien souvent longue, coûteuse et incertaine pour les composés de classe A, étant donné que les candidats sont nombreux. Il est donc indispensable de pouvoir déterminer la classe des composés avant de réaliser une déconvolution de cibles. Mais comment discriminer un composé de classe A d'un composé de classe B ? Les composés identifiés lors des criblages phénotypiques et ciblés étant des inhibiteurs compétitifs de l'ATP, j'ai combiné la chromatographie d'affinité à l'ATP compétitive avec la 2D-DiGE afin de déterminer leur spécificité.

4.1. Chromatographie d'affinité à l'ATP compétitive

La chromatographie d'affinité à l'ATP compétitive exploite tout ce qui a été précédemment développé. Elle consiste en la réalisation d'un Essai simple ou saturant en présence ou en absence du composé d'intérêt (Figure 29A). Ensuite, la comparaison des éluations obtenues avec ou sans compétition par

coloration SYPRO Ruby permet de déterminer rapidement si un composé semble spécifique (quasi-similaire à l'Essai) ou pléiotropique (différent de l'Essai avec la disparition de plusieurs signaux).

4.1.1. Preuve de principe

Comme preuve de principe, j'ai réalisé une chromatographie d'affinité à l'ATP compétitive

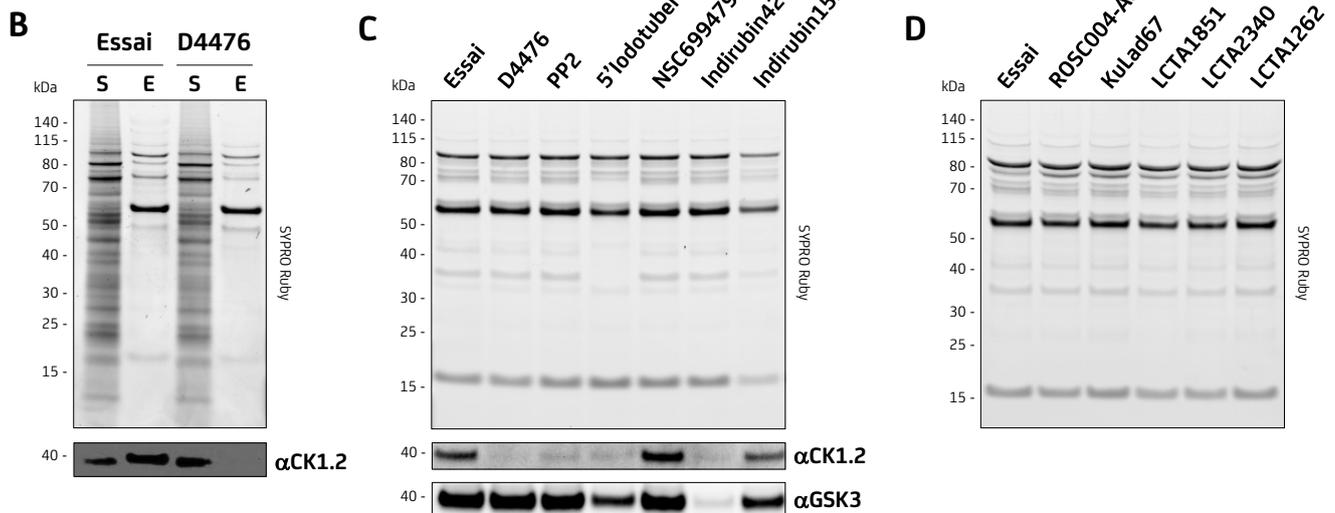
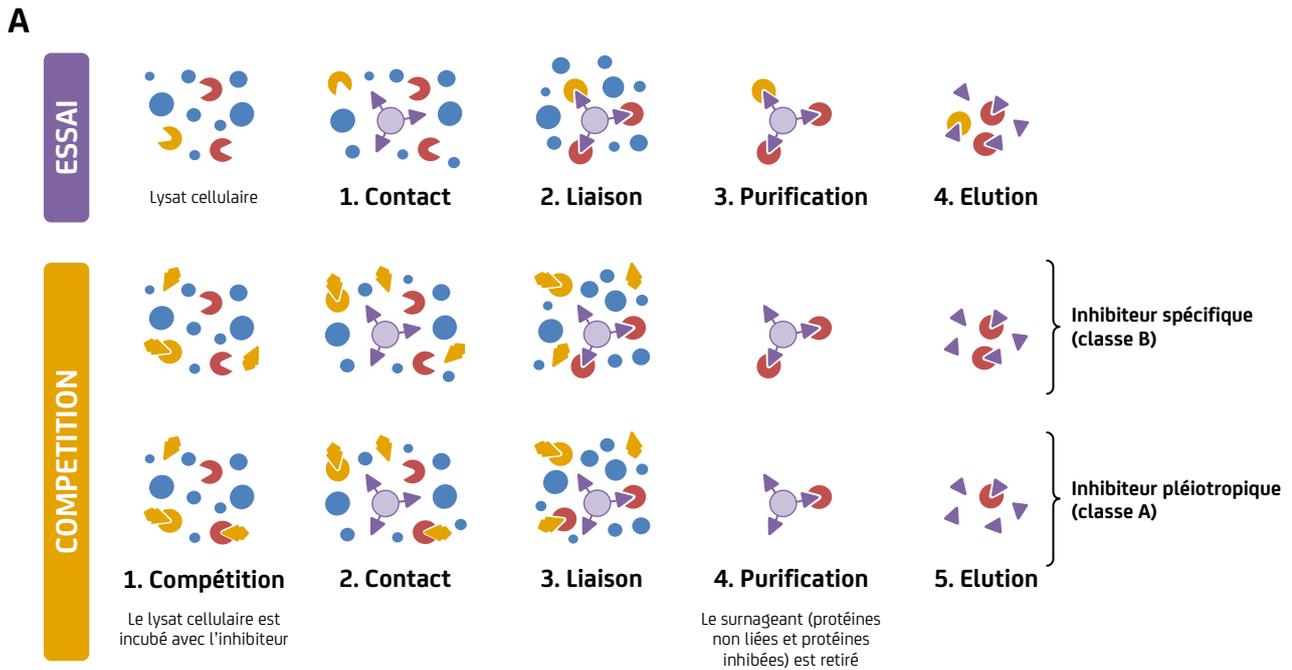


Figure 29. Chromatographie d'affinité à l'ATP compétitive

(A) Représentation schématique de l'essai et de la compétition avec un inhibiteur spécifique ou pléiotropique. (B) **Preuve de principe** : Un extrait total de protéines d'amastigotes axéniques obtenus avec un tampon de lyse TRITON a été soumis à une chromatographie d'affinité à l'ATP sur un mélange des 4 ATP-Agaroses avec ou sans compétition (D4476 : inhibiteur de CK1.2) préalable. Les éluions (E) et les surnageants (S) ont été résolus par SDS-PAGE et soumis à une coloration SYPRO Ruby, ou à un Western blot anti-CK1.2. (C) **Composés issus de criblages ciblés** : Un extrait total de protéines d'amastigotes axéniques obtenus avec un tampon de lyse RIPA a été soumis à une chromatographie d'affinité à l'ATP sur un mélange des 4 ATP-Agaroses avec ou sans compétition préalable (composés issue de criblages ciblés). Les éluions ont été résolues par SDS-PAGE et soumises à une coloration SYPRO Ruby, ou à un Western blot anti-CK1.2 et -GSK3. (D) **Composés issus de criblages phénotypiques** : réplicat de (C) mais en utilisant les composés issus de criblages phénotypiques. Les éluions ont été résolues par SDS-PAGE et soumises à une coloration SYPRO Ruby.

avec l'inhibiteur D4476, connu pour inhiber la Caséine Kinase 1.2 (Rachidi et al., 2014). Pour cela, 1 mg d'extrait de protéines totales d'amastigotes dialysé (Matériel & méthodes II.2.9) a été complété à 250 μ M D4476, 10 mM $MgCl_2$ puis incubé 30 min à 37°C avec une agitation de 800 tr/min (Compétition). Ensuite, deux Essais simples ont été réalisés comme décrit précédemment (Résultats II.2.1) : l'un avec l'extrait protéique qui a été soumis à la compétition et l'autre avec un extrait protéique sans compétition. Puis, les éluions (E) obtenues ont été concentrées dans un volume final de 80 μ l. Ensuite, 20 μ l des éluions et 5 μ l des surnageants (S) ont été résolus par SDS-PAGE et soumis, soit à une coloration SYPRO Ruby, soit à un Western blot anti-CK1.2 (Matériel & méthodes II.2.3, II.2.5 & II.2.6 ; Tableau IV) (Figure 29B).

Les profils obtenus avec les éluions et les surnageants pour la coloration SYPRO Ruby ne montrent aucune différence entre l'Essai et la compétition (D4476). Ce résultat confirme donc la spécificité de D4476 pour CK1.2. Toutefois, il n'est pas exclu que le D4476 puisse inhiber d'autres cibles qui ne peuvent pas être détectées par cette coloration. Concernant les résultats obtenus avec le Western blot anti-CK1.2, je constate dans l'Essai, la présence d'un signal fort dans l'éluion et un signal plus faible dans le surnageant. Comme observé précédemment, CK1.2 a été capturée par l'ATP-Agarose mais pas en totalité (Figure 27). Pour la compétition, je constate la présence d'un signal dans le surnageant mais aucun dans l'éluion, indiquant qu'il n'y a pas de CK1.2 dans cette éluion. Par conséquent, je peux valider mon approche étant donné que la présence de D4476 dans l'extrait total a totalement inhibé la capture de la CK1.2 par l'ATP-Agarose.

4.1.2. Application à des composés issus de criblages ciblés ou phénotypiques

La preuve de principe ayant été établie, j'ai appliqué cette approche aux composés issus des criblages ciblés. Lors du premier test avec ces composés, j'ai observé une précipitation des protéines avec certains des composés, et cela m'a amené à modifier certaines conditions de la compétition. Afin d'éviter ce problème, la compétition a été réalisée avec la solution de liaison au lieu de l'extrait dialysé et incubée à 4°C au lieu de 37°C. De plus la solution de liaison étant déjà à 60 mM $MgCl_2$, seul le composé a

été ajouté à la solution de liaison (250 μ M final). Des compétitions ont été réalisées avec les composés D4476, PP2, 5'Iodotubercidin, NSC699479, Indirubin 42 et Indirubin 1530 (Annexe 6A). Ensuite, les protéines de liaison à l'ATP ont été purifiées comme décrit précédemment, avec en parallèle un Essai sans compétition comme contrôle (Résultats II.2.1). Les éluions obtenues ont été concentrées dans un volume final de 100 μ l, puis 15 μ l ont été soumis à une SDS-PAGE, puis une coloration SYPRO Ruby (Matériel & méthodes II.2.3 & II.2.5) (Figure 29C). Comme précédemment, les profils obtenus pour l'Essai et D4476 sont identiques, confirmant ainsi la spécificité de D4476 et la reproductibilité de la méthode. Les profils obtenus pour les composés PP2, NSC699479 et Indirubin 42 ne montrent aucune différence avec l'Essai, suggérant que ces composés sont plutôt spécifiques (classe B). Les profils des composés 5'Iodotubercidin et Indirubin 1530 présentent des différences par rapport à l'Essai, notamment avec la disparition de certaines protéines. Cela suggère que ces composés sont pléiotropiques (classe A).

Ensuite, afin de déterminer si les composés sont bien des inhibiteurs de CK1.2, 15 μ l des éluions ont été déposés sur gel et soumis à une SDS-PAGE, puis successivement, à un Western blot anti-CK1.2 et -GSK3 en guise de contrôle (Matériel & méthodes II.2.3 & II.2.6 ; Tableau IV) (Figure 29C). Comme observé précédemment, la protéine CK1.2 est présente dans l'éluion de l'Essai et absente dans celle de la compétition D4476. Ensuite, j'observe la présence de CK1.2 dans l'éluion de la compétition NSC699479 et Indirubin 1530, indiquant que ces composés n'ont pas été capables de l'inhiber. Alors que pour les autres composés, la quantité de CK1.2 présente dans l'éluion est très faible, indiquant que ces composés sont des inhibiteurs de cette protéine. Pour le Western blot contrôle avec GSK3, la quantité de protéine présente dans les éluions de D4476, PP2 et NSC699479 est identique à celle de l'Essai. Tandis que pour les éluions de Indirubin 1530, 5'Iodotubercidin et Indirubin 42, la quantité de GSK3 présente est plus faible, voire nulle pour Indirubin 42. Par conséquent, ces trois composés sont capables d'inhiber la protéine GSK3.

Pour conclure, cette approche m'a permis de réaliser rapidement et facilement une première classification des composés par rapport à leur profil de coloration SYPRO Ruby et leur capacité d'inhibition de CK1.2

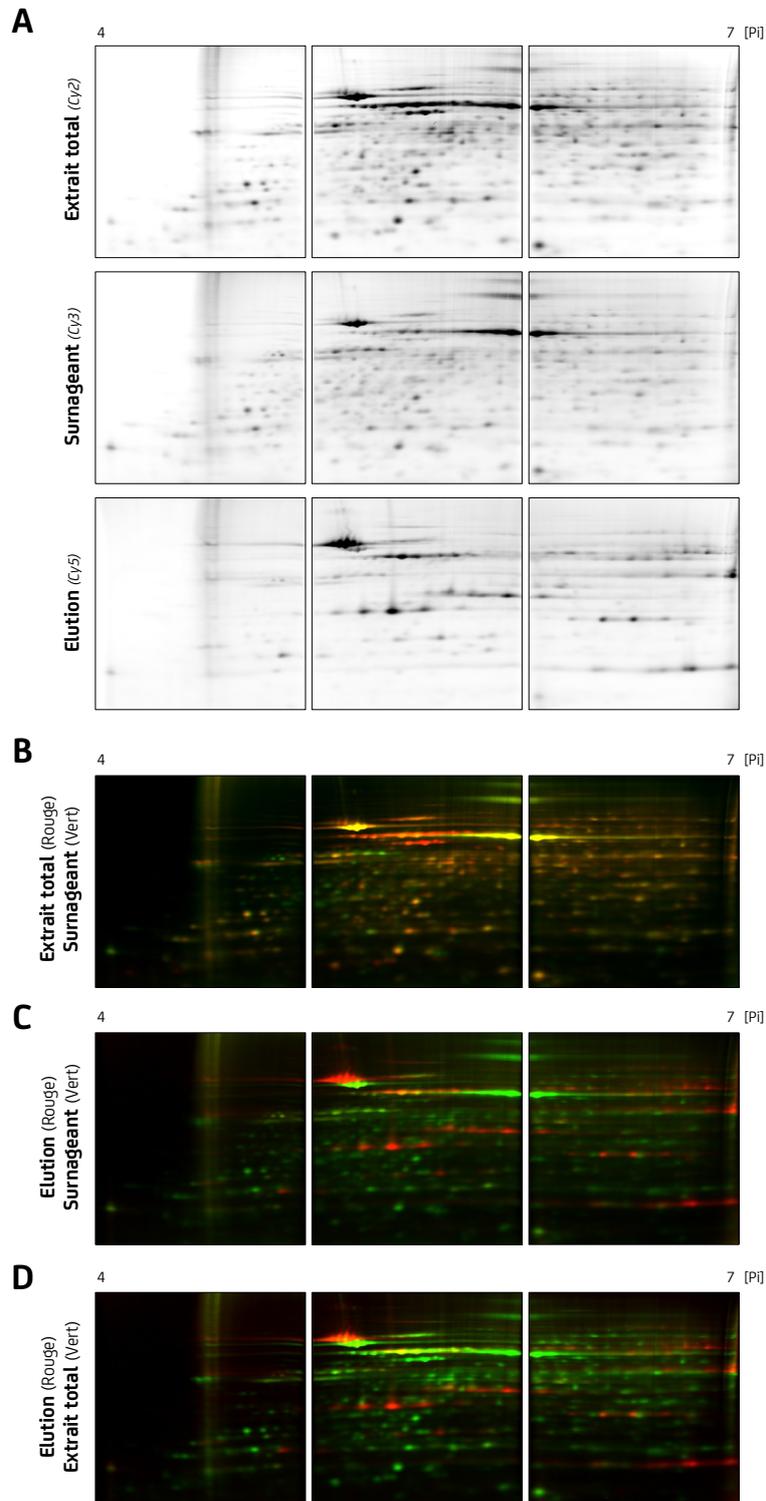


Figure 30. Comparaison par 2D-DiGE des produits issus d'une chromatographie d'affinité à l'ATP

(A) Un extrait total de protéines d'amastigotes axéniques a été soumis à une chromatographie d'affinité à l'ATP. L'éluion (Cy5), le surnageant (Cy3) et l'extrait total (Cy2) ont été soumis à un 2D-DiGE. Les images ont été traitées avec le logiciel ImageJ afin d'ajuster l'intensité du signal entre les gels. **(B, C, D)** Superpositions des images de (A). Les couleurs rouge et verte sont arbitraires mais nécessaires pour la superposition afin de pouvoir révéler les protéines communes (jaune) aux deux échantillons comparés.

(Western blot). Au final, j'ai pu identifier le composé PP2 comme étant un inhibiteur spécifique de CK1.2, mais aussi le composé Indirubin 42 comme étant un inhibiteur potentiellement spécifique de CK1.2 et GSK3. L'inhibition de GSK3 par l'Indirubin 42 est tout à fait cohérente étant donné qu'il s'agit d'un dérivé de l'Indirubin, qui est un composé connu pour inhiber cette protéine (Meijer et al., 2003).

Ayant déterminé la spécificité de certains composés issus des criblages ciblés avec leur profils de coloration SYPRO Ruby, j'ai appliqué cette méthode aux composés issus des criblages phénotypiques. L'expérience précédente de coloration SYPRO Ruby a donc été répétée, mais en utilisant les composés ROSC004-A07, KuLad 67, LCTA 1851, LCTA 2340 et LCTA 1262 (Annexe 6B) (Figure 29D). Les profils de coloration SYPRO Ruby des composés ne montrent aucune différence par rapport à l'Essai, indiquant que ces composés sont très probablement spécifiques, ou qu'ils ne ciblent pas de protéines de liaison à l'ATP.

Toutefois, bien que cette approche permette de visualiser rapidement si un composé semble spécifique ou pléiotropique, la résolution des éluions en fonction de leur masse (une dimension) ne permet pas de visualiser les différences entre des protéines de même masse. En effet, si une protéine faiblement abondante est inhibée par un composé, mais qu'elle co-migre avec une autre protéine très abondante de même masse, il est alors impossible de la visualiser. Dans le cas des composés issus des criblages ciblés, il est aisé de valider la spécificité avec un Western blot, sans pour autant révéler l'effet hors cible, alors que pour les composés issus des criblages phénotypiques, il est impossible d'utiliser cette technique puisque les cibles sont inconnues. Il est donc indispensable d'accroître la résolution de la méthode et d'utiliser une technique quantitative afin de pouvoir réellement valider la classe de spécificité de nos composés.

4.2. Détermination de la spécificité de composés par 2D-DiGE

La 2D-DiGE (Differential Gel Electrophoresis) est une technique d'analyse différentielle des protéines sur gel qui permet la séparation des protéines en fonction de leur point isoélectrique (Pi) et de leur masse. Les échantillons protéiques à comparer sont marqués avec des fluorochromes différents possédant la même masse, mais ayant des longueurs

d'onde d'excitation et d'émission différentes (Cy2, Cy3, Cy5). Ainsi, deux échantillons marqués avec des fluorochromes différents pourront être mélangés et séparés sur un même gel. Ensuite, l'acquisition d'images aux longueurs d'onde spécifiques de chaque fluorochrome permet d'obtenir des images, qui pourront être comparées en s'affranchissant des variations de migration entre gels, souvent observées lors d'analyses réalisées de manière conventionnelle. De plus, il est également possible d'utiliser un standard interne (mélange de tous les échantillons à analyser) qui permet de calculer les ratios d'abondance de chaque protéine sur un gel, et de normaliser ces ratios grâce à l'utilisation d'un logiciel d'analyse d'image dédié (ex : Progenesis SameSpots). Donc, étant donné les limitations précédemment décrites pour la méthode en une dimension, j'ai décidé d'utiliser la technique 2D-DiGE afin de séparer les protéines de mes éluions en fonction de leur point isoélectrique et de leur masse. Cette méthode me permettra une meilleure séparation et visualisation des protéines, mais aussi de comparer directement l'essai et la compétition dans un même gel pour valider définitivement la classe de spécificité de nos composés.

4.2.1. Visualisation des protéines de liaison à l'ATP par 2D-DiGE

Comme premier test, j'ai réalisé une chromatographie d'affinité à l'ATP (Essai simple), comme décrit précédemment, à partir de 1 mg d'extrait de protéines totales d'amastigotes axéniques (Résultats II.2.1). Puis, les protéines contenues dans l'éluion, le surnageant et 40 µg d'extrait de protéines totales ont été précipitées avec le ReadyPrep™ 2-D Cleanup Kit et solubilisés dans 20 µl de tampon d'échantillon compatible 2-D (Matériel & méthodes II.2.10 ; Tableau III). Ensuite, les protéines respectivement de l'éluion, du surnageant et de l'extrait total ont été marquées avec 1 µl de G-Dye300 (Cy5), G-Dye200 (Cy3) et G-Dye100 (Cy2) fournis dans le Refraction-2D™ Labelling Kit (DyeAGNOSTICS), en accord avec les instructions du fournisseur. Finalement, les protéines marquées ont été mélangées, puis séparées par focalisation isoélectrique sur un IPG Strip* pH 4-7 suivi d'une électrophorèse sur gel Novex NuPAGE 2D well (Matériel & méthodes II.2.10). Les signaux de fluorescence de chaque fluorochrome ont été acquis

* bandelette de plastique sur laquelle est pré-moulé un gel de Polyacrylamide contenant un gradient de pH immobilisé.

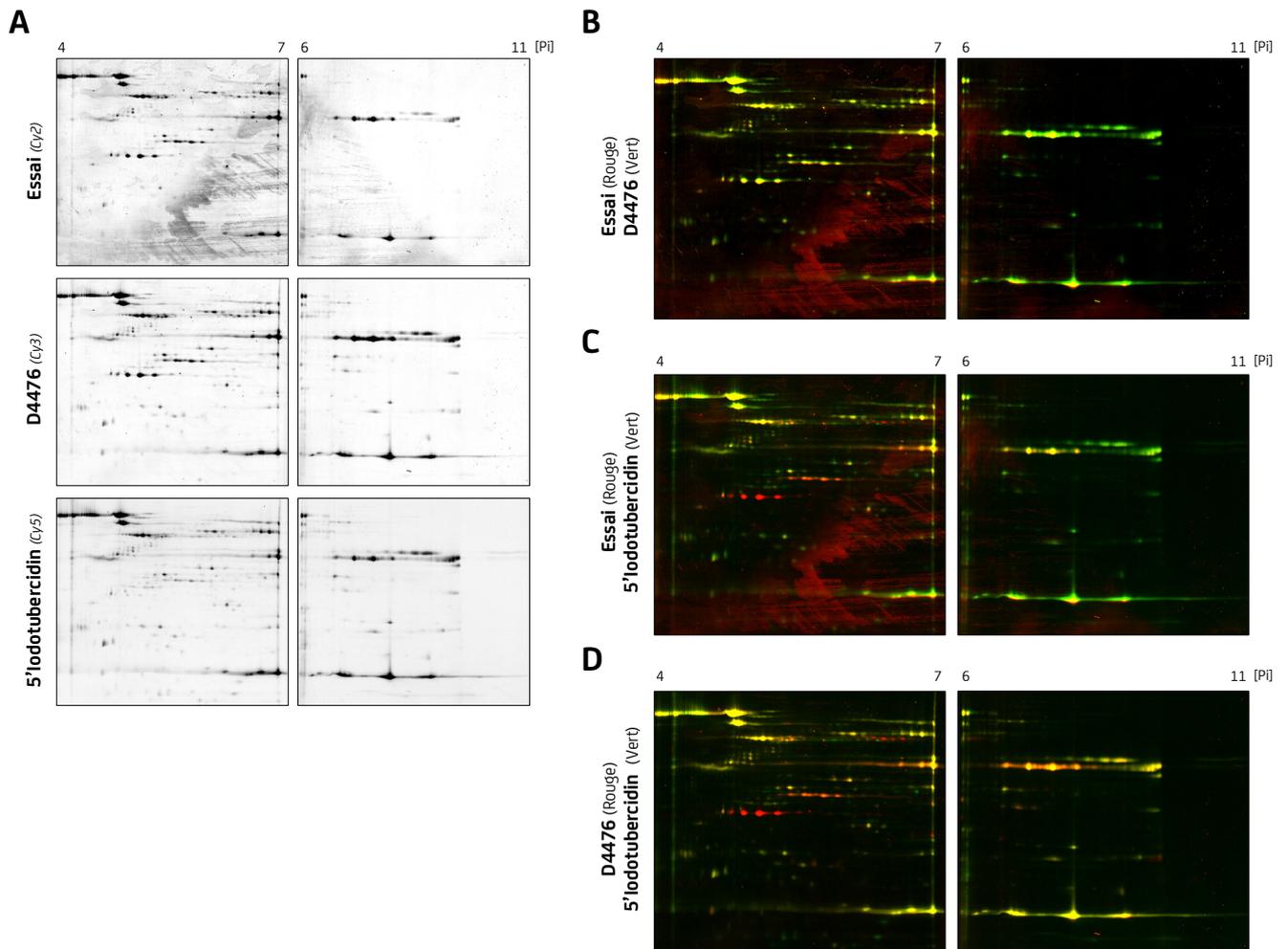


Figure 31. Détermination de la spécificité de composés par 2D-DiGE : Preuve de principe

(A) Un extrait total de protéines d'amastigotes axéniques a été soumis à une chromatographie d'affinité à l'ATP avec ou sans compétition préalable (D4476 et 5'Iodotubercidin), puis les éluions ont été soumises à un 2D-DiGE. Les images ont été traitées avec le logiciel ImageJ afin d'ajuster l'intensité du signal entre les gels. (B, C, D) Superpositions des images de (A). Les couleurs rouge et verte sont arbitraires mais nécessaires pour la superposition afin de pouvoir révéler les protéines communes (jaune) aux deux échantillons comparés.

avec un scanner Typhoon (Amersham Biosciences) et les images obtenues ont été traitées avec le logiciel ImageJ afin d'ajuster l'intensité du signal entre les images et créer les superpositions (Figure 30).

Les images en noir et blanc correspondent aux images obtenues individuellement pour chaque échantillon (extrait total, surnageant et élution) (Figure 30A). Le signal obtenu avec le Cy5 (élution) a été légèrement augmenté afin de visualiser les protéines faiblement abondantes. La migration en deux dimensions a séparé les nombreuses protéines de même masse, et ainsi permis aux protéines de faible abondance de se distinguer par rapport aux protéines abondantes. Les images en couleur (Figure 30B, 30C & 30D) correspondent à la superposition des images obtenues dans la Figure 30A. La couleur verte ou rouge est attribuée arbitrairement aux signaux de fluorescence de l'une ou l'autre des images à comparer et la superposition des deux images colorisées peut faire apparaître des signaux jaunes qui correspondent aux signaux communs entre les deux images et indiquent que ces protéines sont présentes dans les deux échantillons, tandis que les signaux rouges ou verts correspondent aux protéines présentes dans l'un ou l'autre des échantillons. Grâce à cette superposition, la technique 2D-DiGE révèle son efficacité car elle permet de comparer simultanément les protéines présentes dans deux échantillons.

La comparaison de l'extrait total (rouge) avec le surnageant (vert) montre que la majorité des signaux sont jaunes, indiquant que la majorité des protéines présentes dans les deux échantillons sont identiques (Figure 30B). Cependant, j'observe un certain nombre de signaux rouges indiquant que ces protéines ne sont plus présentes dans le surnageant et donc qu'elles ont été capturées par l'ATP-Agarose. Ces protéines sont encore plus visibles lorsque l'on compare l'élution (rouge) avec le surnageant (vert) (Figure 30C). En effet, quasiment aucun signal jaune n'est visible, indiquant que la quasi-totalité des protéines capables de fixer à l'ATP-Agarose ne sont plus présentes dans le surnageant. Et finalement, la comparaison de l'élution (rouge) avec l'extrait total (vert) permet de visualiser ces protéines dans le protéome total (Figure 30D). Toutefois, cette comparaison ne me permet pas de juger de l'enrichissement des protéines présentes dans l'élution étant donné que le signal obtenu avec le Cy5 (élution) a été légèrement augmenté et fausse

ainsi toute quantification. Pour conclure, ces résultats montrent qu'il est possible de visualiser les différences entre les protéines présentes dans l'élution et celles présentes dans le surnageant ou l'extrait total. Il devrait donc être tout à fait possible de visualiser les différences entre les protéines présentes dans l'élution d'un Essai et celles d'une compétition pour déterminer la spécificité de nos composés.

4.2.2. Preuve de principe

Pour déterminer la spécificité de nos composés par 2D-DiGE, j'ai décidé d'établir une preuve de principe en utilisant les composés D4476 (spécifique) et 5'Iodotubercidin (pléiotropique). Pour cela, j'ai réalisé des chromatographies d'affinité compétitives avec ces deux composés (Résultats II.4.1.2). Ensuite, les protéines contenues dans les éluions de chaque condition ont été précipitées, marquées et réunies comme décrit précédemment (Résultats II.4.2.1). La moitié du mélange des échantillons a été chargé sur un IPG Strip pH 4-7 et l'autre moitié sur un IPG Strip pH 6-11, afin de couvrir l'intégralité des points isoélectriques des protéines présentes dans mes échantillons. Une focalisation isoélectrique suivi d'électrophorèses sur 2DHPE™ Large Gels 12,5% ont été effectuées, et les signaux de fluorescence ont été acquis avec un scanner Typhoon (Amersham Biosciences) (Matériel & méthodes II.2.10). Les images obtenues ont été traitées avec le logiciel ImageJ afin d'ajuster l'intensité du signal et de créer les superpositions (Figure 31).

Premièrement, je constate que l'utilisation des IPG Strips pH 4-7 et 6-11 couplée à l'électrophorèse sur 2DHPE™ Large Gels a permis d'accroître fortement la résolution des protéines, bien que la focalisation isoélectrique pour l'IPG Strip pH 6-11 ne soit pas faite sur l'intégralité de celui-ci (environ 2/3) (Figure 31A). Deuxièmement, l'ensemble des signaux obtenus pour l'Essai et les compétitions sont assez similaires, bien que l'intense bruit de fond sur les images de l'Essai masque les protéines faiblement abondantes qui sont clairement visibles pour les compétitions. Pour les comparaisons de l'Essai (rouge) avec les composés (vert) (Figure 31B & 31C), il est difficile d'interpréter les résultats en raison du bruit de fond présent dans l'Essai. Toutefois, pour la comparaison avec le D4476, tous les signaux visibles sont jaunes, indiquant que les protéines présentes dans les deux

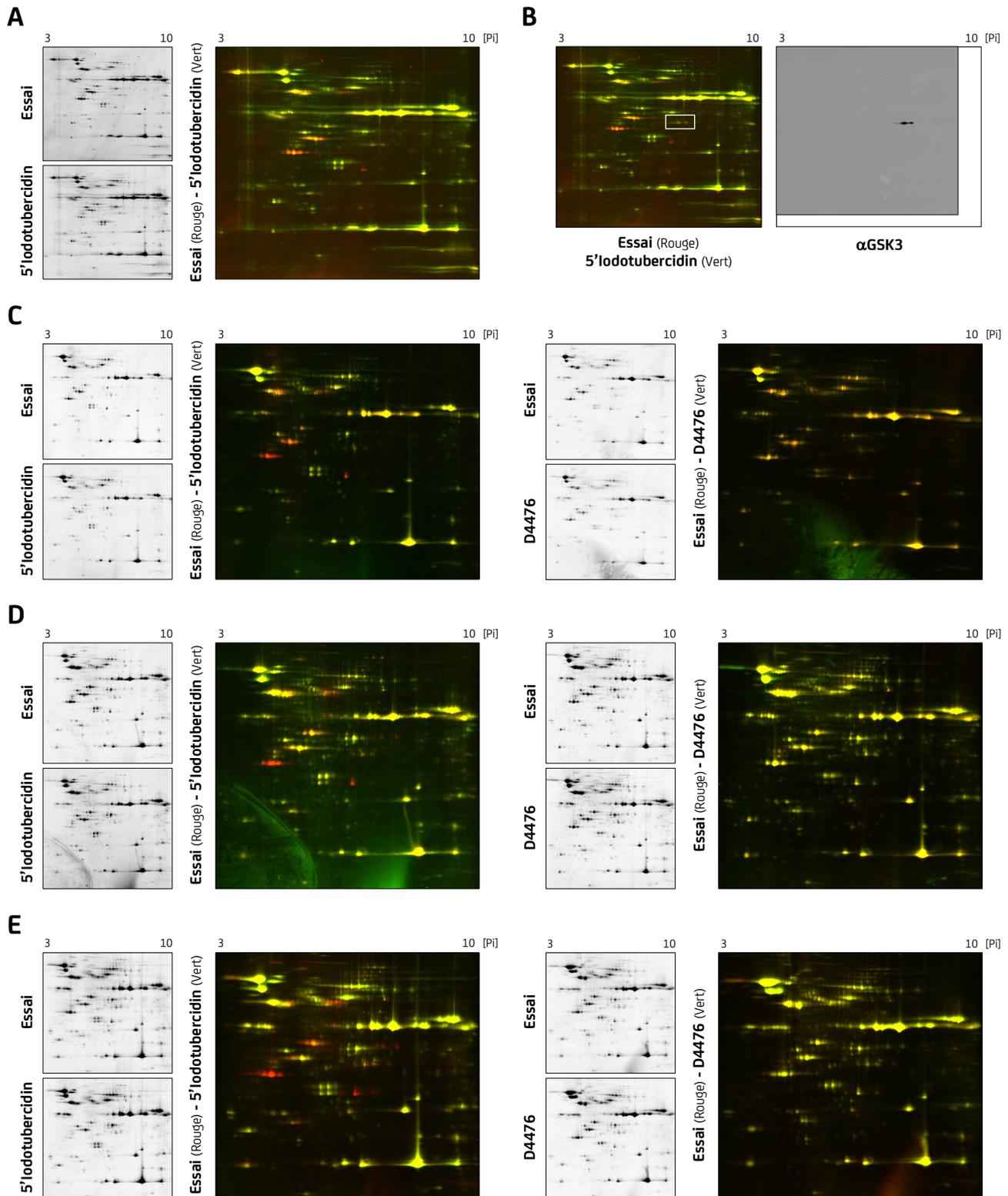


Figure 32. Optimisation de la 2D-DiGE

(A) Un extrait total de protéines d'amastigotes axéniques a été soumis à une chromatographie d'affinité à l'ATP avec ou sans compétition préalable (5'Iodotubercidin ou D4476), suivi d'une 2D-DiGE avec un IPG Strip pH 3-10 et un gel 10-15% acrylamide. (B) Un Western Blot anti-GSK3 a été réalisé à partir du gel obtenu en (A) après acquisition des images. (C) Réplicat de (A) mais la concentration d'IPG Buffer a été augmentée lors de la réhydratation de l'IPG Strip, et l'échantillon a été ajusté à 10 mM de DTT et 0,5 % IPG Buffer. (D) Réplicat de (A) mais l'électrophorèse bidimensionnelle a été réalisée avec un gel 12,5% acrylamide et la concentration des fluorochromes a été ajustée à 16 pmol/μg d'échantillons. (E) Réplicat technique de (D) en inversant les fluorochromes utilisés pour le marquage de l'essai et de la compétition.

conditions semblent identiques et que le D4476 pourrait être spécifique. Pour la comparaison avec le 5'Iodotubercidin, une grande majorité des signaux est jaune, mais il y a également de nombreux signaux rouges qui indiquent que ces protéines sont absentes dans l'élution de la compétition. Donc il semblerait que le 5'Iodotubercidin soit un composé pléiotropique. Finalement, en raison de la mauvaise qualité des images de l'Essai, j'ai comparé les images des deux compétitions entre elles : D4476 (rouge) et 5'Iodotubercidin (vert) (Figure 31D). De nouveau, je constate la présence de nombreux signaux rouges indiquant que le 5'Iodotubercidin a inhibé de nombreuses protéines lors de la compétition. Toutefois, afin de valider ces résultats des répliquats techniques et biologiques sont nécessaires.

4.3. Optimisation de la détermination de la spécificité de composés par 2D-DiGE

Bien que le coût d'une expérience 2D-DiGE soit plus faible que celui d'une analyse en MS pour la comparaison de deux échantillons, j'ai réalisé quelques optimisations afin de les réduire au maximum.

4.3.1. Réductions du coût de la méthode

Comme précédemment, j'ai réalisé une chromatographie d'affinité compétitive avec le 5'Iodotubercidin (Résultats II.4.1.2). Puis afin de diviser le coût de l'expérience par deux, j'ai utilisé un IPG Strip pH 3-10 qui permet de couvrir l'intégralité des points isoélectriques des protéines sur un seul IPG Strip au lieu de deux. J'ai également utilisé un gel à gradient 2DHPE™ Large Gels 10-15% afin de déterminer si la séparation des protéines en fonction de leur masse était meilleure sur ce support. Finalement, les images ont été acquises et traitées comme précédemment (Figure 35A).

L'utilisation d'un IPG Strip pH 3-10 a permis de séparer les protéines sur l'intégralité de la gamme de pH sans problème de focalisation pour les pH basiques comme précédemment observé avec l'IPG Strip pH 6-11. Cependant, les signaux obtenus sont beaucoup plus diffus mais cela est très probablement dû à une plus grande proximité des signaux émis par les protéines. En effet, les protéines ont été séparées sur la longueur d'un seul IPG Strip alors que dans l'expérience précédente elles étaient séparées sur le double de distance. Il est donc indispensable d'optimiser la focalisation

isoélectrique des protéines afin d'éviter cet effet comète des signaux. Et finalement, l'utilisation du gel avec gradient 10-15% n'a pas permis d'améliorer de manière significative la séparation de protéines en fonction de leur masse. Ensuite, pour la comparaison de l'Essai avec le 5'Iodotubercidin (Figure 31C), les résultats confirment ceux précédemment obtenus avec la présence d'une majorité de signaux jaunes et de nombreux signaux rouges. De nouveau, je constate que de nombreuses protéines sont absentes dans l'élution du 5'Iodotubercidin, indiquant que ce composé est un inhibiteur pléiotropique des protéines de liaison à l'ATP.

Ensuite, afin de déterminer s'il était possible d'identifier la protéine de référence GSK3 sur un gel 2D, j'ai réalisé un Western blot anti-GSK3 après acquisition des signaux de fluorescence (Matériel & méthodes II.2.6 ; Tableau IV) (Figure 32B). Et en effet, j'ai observé la présence de deux signaux correspondant à la masse (40,7 kDa) et au point isoélectrique (7,5) de GSK3. La présence du deuxième signal pourrait être due à une modification post-traductionnelle de GSK3, telle que la phosphorylation qui modifie le point isoélectrique des protéines en les rendant plus acides. De plus, ces signaux correspondent parfaitement aux signaux de fluorescence présents dans le cadre blanc sur la superposition de l'Essai avec le 5'Iodotubercidin (Figure 32B). De surcroît, sur le gel ils sont plutôt d'une couleur orangée indiquant que le 5'Iodotubercidin aurait inhibé partiellement la capture de GSK3, ce qui est en totale adéquation avec les résultats précédemment obtenus (Figure 29C). Pour conclure, les résultats du Western blot anti-GSK3 ont permis de localiser les signaux de fluorescence de cette protéine tout en validant l'effet du 5'Iodotubercidin sur GSK3. D'autre part, il aurait été intéressant de détecter les protéines CK1.2 et HSP70, mais ces expériences n'ont pas pu être réalisées en raison d'un volume trop élevé d'anticorps nécessaire.

4.3.2. Contrôle interne et optimisation de la focalisation isoélectrique

Pour réaliser une analyse semi-quantitative ou quantitative des images obtenues par 2D-DiGE avec un logiciel dédié, il est nécessaire d'avoir un contrôle interne qui serve d'image de référence. Pour cela, j'ai répété l'expérience précédente (Résultats II.4.3.2), mais en modifiant quelques étapes du protocole de 2D-DiGE (Matériel & méthodes II.2.10). Pour obtenir

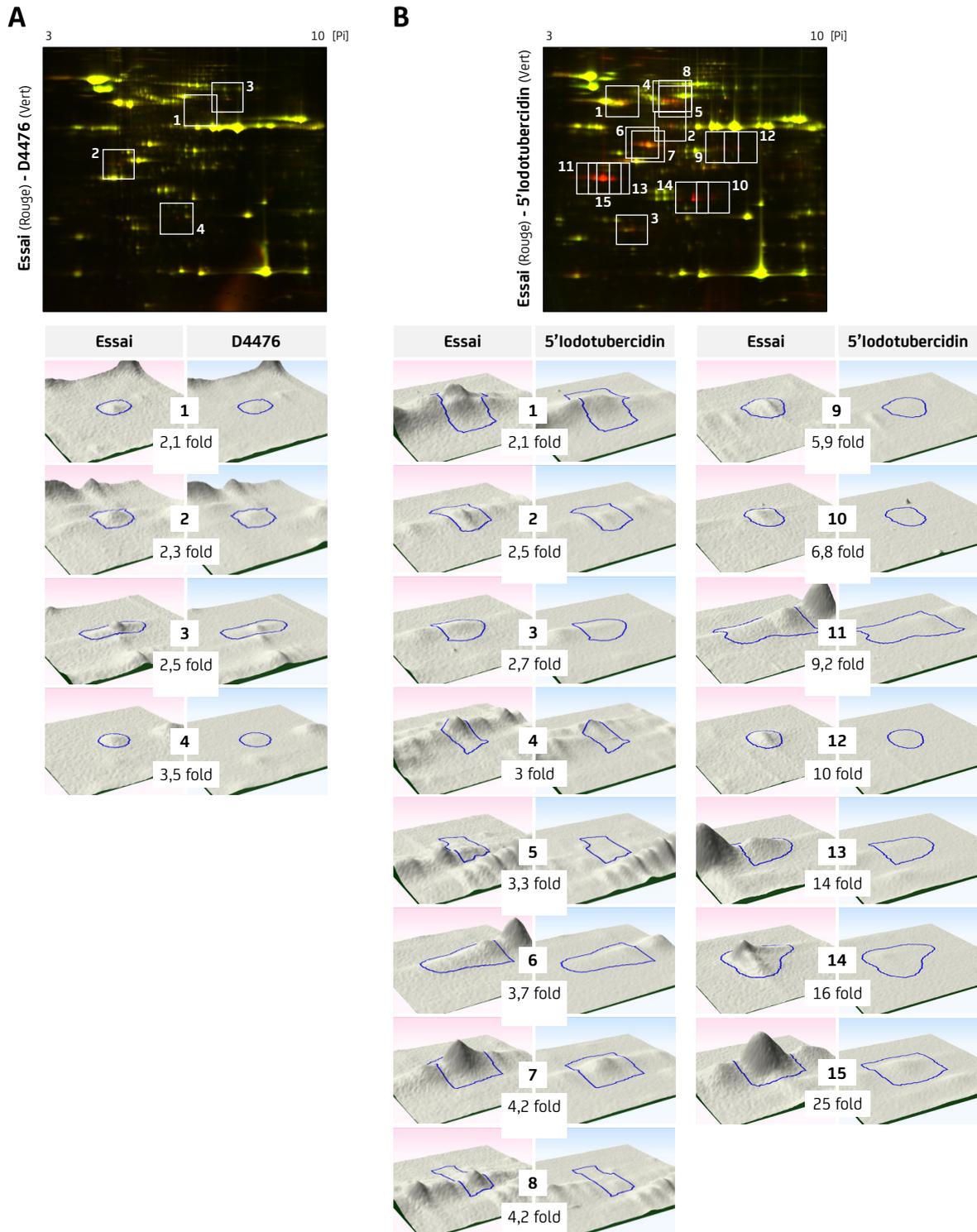


Figure 33. Analyse de résultats de la figure 32E avec le logiciel SameSpots

Les résultats de la figure 32E ont été analysés avec le logiciel SameSpots. Les protéines dont l'intensité de fluorescence est diminuée d'au moins deux fois dans la compétition par rapport à l'Essai sont représentées en 3D. Chaque zone représentée en 3D est reportée sur la superposition de l'Essai avec la compétition. **(A)** Analyse des résultats obtenus avec le D4476. **(B)** Analyse des résultats obtenus avec le 5'Iodotubercidin.

un contrôle interne, les protéines de chaque élution ont été solubilisées avec 30 µl de tampon d'échantillon compatible 2-D après l'étape de précipitation au lieu de 20 µl (Tableau III). Ensuite, 20 µl de l'Essai ont été marqués avec 1 µl de G-Dye200 (Cy3) et 20 µl de la Compétition ont été marqués avec 1 µl de G-Dye300 (Cy5). Les volumes restant de l'Essai et de la Compétition ont été mélangés et marqués avec 1 µl de G-Dye100 (Cy2) pour créer le contrôle interne. D'autre part, pour améliorer la focalisation des protéines, j'ai augmenté la concentration d'IPG Buffer pH 3-10 utilisé pour réhydrater l'IPG Strip de 0,5% à 0,6%, mais également, complété l'échantillon final (échantillons marqués + DeStreak Rehydration Solution) à 10 mM DTT et 0,5% IPG Buffer pH 3-10 (GE Healthcare Life Sciences). L'IPG Buffer permet d'améliorer la solubilité des protéines en minimisant leur agrégation lors de la séparation et le DTT de dissocier les liaisons disulfures présentes et de maintenir toutes les protéines dans leur état complètement réduit.

Les résultats obtenus montrent que les modifications apportées ont permis d'améliorer significativement la focalisation des protéines et de faire disparaître par la même occasion l'effet diffus des signaux (Figure 32C). Toutefois, bien que les résultats soient de nouveaux identiques aux précédents (Figure 31), l'intensité trop faible des signaux ne m'a pas permis d'analyser mes résultats avec le logiciel d'analyse d'images SameSpots.

4.3.3. Optimisation du marquage des protéines et chromatographie d'affinité successive

Afin d'accroître l'intensité du signal de fluorescence, j'ai optimisé les conditions de marquage et changé de fournisseur pour les fluorochromes. D'autre part, j'ai également augmenté la quantité de protéines présente dans les éluions en réalisant un Essai saturant (Figure 26A).

A cet effet, des chromatographies d'affinité successives de 3 passages avec ou sans compétition (5'Iodotubercidin et D4476) ont été réalisées, puis les éluions obtenues ont été soumises à une 2D-DiGE (Résultats II.3.1, II.4.1.2 & II.4.3.2), mais en modifiant le protocole de marquage des protéines. Après l'étape de précipitation, j'ai solubilisé les protéines de chaque condition dans 35 µl de tampon d'échantillon compatible 2-D (Tableau III) au lieu de 30 µl, et utilisé 5 µl pour réaliser une quantification

des protéines (Matériel & méthodes II.2.2). Ensuite, j'ai utilisé le 3Dye Cy2/3/5 fluor Labeling Pack (Interchim) pour marquer les protéines présentes dans l'Essai (Cy3), la Compétition (Cy5) et le contrôle interne (Cy2) en ajustant la concentration des fluorochromes (Cy2, Cy3, Cy5) à 16 pmol/µg de protéines. D'autre part, j'ai utilisé des 2DHPE™ Large Gels 12,5% pour l'électrophorèse afin de permettre une meilleure séparation des protéines de haut poids moléculaire. Les résultats obtenus montrent que les modifications apportées permettent d'augmenter considérablement la détection des protéines (Figure 32D). En effet, l'intensité des signaux est beaucoup plus forte et permet de révéler de nombreuses protéines qui n'étaient pas visibles jusqu'à présent. Toutefois, afin de valider ces résultats, j'ai effectué un réplicat technique en inversant les fluorochromes utilisés pour le marquage de l'Essai (Cy5) et de la Compétition (Cy3) (Figure 32E). Les images obtenues étant similaires aux précédentes, je peux donc valider la reproductibilité de la méthode et les résultats obtenus.

Concernant l'analyse des résultats, pour la comparaison de l'Essai avec le D4476, tous les signaux visibles sont jaunes à l'exception d'un ou deux signaux rouges (Figure 32D & 32E), indiquant que la quasi-totalité des protéines présentes dans les deux conditions sont identiques. Je peux donc définitivement valider les résultats obtenus en une dimension (Figure 29C) et lors de la preuve de principe de la 2D-DiGE (Figure 31), et affirmer que le D4476 est un composé de classe B, c'est-à-dire spécifique. Ensuite, pour la comparaison de l'Essai avec le 5'Iodotubercidin, une grande majorité des signaux est jaune, mais il y a également de nombreux signaux rouges qui indiquent que ces protéines n'ont pas pu se fixer à l'ATP-Agarose en présence de ce composé. Par conséquent, ces résultats confirment ceux précédemment obtenus (Figure 29C, 31, 32A & 32C), à savoir que le 5'Iodotubercidin est un composé de classe A, donc pléiotropique.

Par la suite, j'ai utilisé le logiciel d'image dédié à la 2D-DiGE, Progenesis SameSpots, et analysé les images de la figure 32E (Figure 33). Le logiciel m'a permis d'analyser les signaux obtenus protéine par protéine en générant des images 3D correspondant à l'intensité du signal. Ce logiciel permet ainsi de visualiser précisément les différences entre l'Essai et

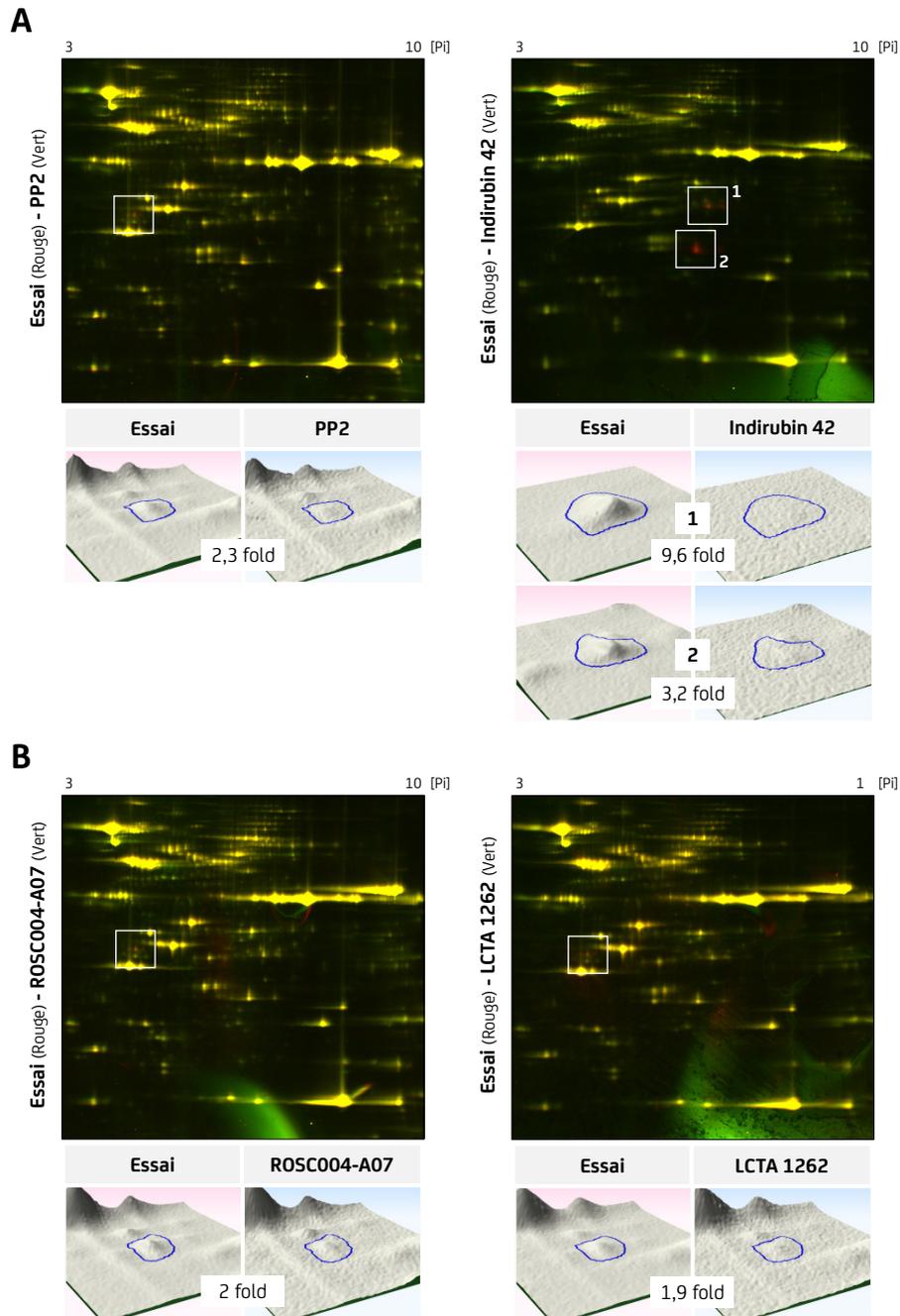


Figure 34. Détermination de la spécificité des composés issus des criblages

Des extraits totaux de protéines d'amastigotes axéniques ont été soumis à une chromatographie d'affinité à l'ATP avec ou sans compétition, suivit d'une 2D-DiGE. Les images ont été traitées avec le logiciel ImageJ afin d'ajuster l'intensité du signal pour créer les superpositions. En parallèle, les images brutes ont été analysées avec le logiciel SameSpots et les protéines dont l'intensité de fluorescence est diminuée dans la compétition ont été représentées en 3D et encadrées sur la superposition. **(A)** Analyse des résultats obtenus avec les composés identifiés par ciblage ciblé. **(B)** Analyse des résultats obtenus avec les composés identifiés par ciblage phénotypique.

la Compétition. Pour cette analyse, je n'ai conservé que les protéines dont l'intensité de fluorescence est diminuée d'au moins deux fois afin de ne pas prendre en compte de faux positifs.

Pour la compétition avec le D4476 (Figure 33A), l'analyse a permis d'identifier 4 protéines dont l'intensité est entre 2 et 3 fois inférieure à celle de l'Essai, indiquant que ces protéines sont potentiellement des cibles de D4476. Cependant, aucune de ces protéines ne possède la masse (39,8 kDa) ou le point isoélectrique (8,3) de CK1.2, indiquant que cette protéine est très probablement en dessous du seuil de détection de la méthode en raison d'une trop faible abondance de cette protéine dans mes échantillons. Cette hypothèse aurait pu être confirmée par la réalisation d'un Western blot anti-CK1.2, mais étant donné la quantité élevée d'anticorps nécessaire pour cette expérience, je n'ai pas pu la réaliser. Pour la compétition avec le 5'Iodotubercidin (Figure 33B), l'analyse a permis d'identifier 15 protéines dont l'intensité varie de 2 à 25 fois par rapport à l'Essai, confirmant encore une fois que ce composé est pléiotropique. De plus, lors de cette analyse, les signaux correspondant à la protéine GSK3 ont également pu être identifiés, mais avec une diminution de l'intensité de 1,7 fois uniquement. Toutefois, ce résultat coïncide parfaitement avec les résultats obtenus précédemment (Figure 29C & 31B) indiquant que le composé 5'Iodotubercidin inhibe partiellement GSK3.

4.3.4. Conclusion

Cette approche utilisant la technique 2D-DiGE pour déterminer la spécificité d'un composé s'est révélée être beaucoup plus puissante que l'approche utilisant la coloration SYPRO Ruby en une dimension. En effet, elle permet de séparer l'intégralité des protéines présentes dans les éluions de l'Essai et de la compétition en fonction de leur masse et de leur point isoélectrique dans un même gel. Mais aussi, de déterminer de façon plus précise la spécificité d'un composé en superposant les signaux de fluorescence des deux conditions. De plus, il est également possible d'analyser de manière semi-quantitative les résultats obtenus avec le logiciel SameSpots. Donc, bien que la sensibilité de détection de cette approche ne permette pas d'identifier les protéines très faiblement abondantes, elle permet de déterminer en peu de temps et pour un moindre coût la spécificité d'un composé.

4.4. Détermination de la spécificité de composés issus des criblages

L'approche décrite ci-dessus étant établie et validée, j'ai décidé de l'appliquer aux composés identifiés dans les criblages ciblé et phénotypique. Les composés PP2, Indirubin 42, ROSC004-A07 et LCTA 1262 (Annexe 6) ont été utilisés pour les compétitions, puis j'ai réalisé les chromatographies d'affinité successives de 3 passages. Les éluions de l'Essai et de la Compétition ont été soumises à une 2D-DiGE comme décrit ci-dessus (Résultats II.4.3.3).

Les résultats obtenus pour l'ensemble des composés montrent que, comme pour le D4476, une grande majorité des signaux visibles sont jaunes lorsque l'on compare l'Essai avec la compétition (Figure 34). Ces résultats suggèrent donc que les quatre composés testés sont très probablement de classe B (spécifique). Cependant, je remarque quand même la présence de quelques signaux rouges indiquant que certaines protéines ont été inhibées. Afin de déterminer plus précisément le nombre de protéines inhibées, j'ai analysé ces résultats avec le logiciel SameSpots. Pour les compétitions PP2, ROSC004-A07 et LCTA 12620 (Figure 34A & 34B), j'ai identifié une seule et même protéine dont l'intensité est environ 2 fois plus faible dans la compétition par rapport à l'Essai, indiquant que cette protéine est probablement inhibée par les trois composés. La diminution d'intensité du signal de cette protéine a également été retrouvée pour les compétitions D4476 et 5'Iodotubercidine, avec une diminution de 1,5 et 2,3 fois respectivement. Cette observation laisse donc supposer que ce résultat ne serait pas dû à la compétition, ou bien qu'il s'agirait d'une protéine qui pourrait se lier à tous nos composés. Pour finir, l'analyse des résultats pour la compétition Indirubin 42 a révélé la présence de deux protéines dont l'intensité est diminuée entre 3 et 10 fois par rapport à l'Essai (Figure 34A). Le signal de la protéine dont l'intensité est diminuée près de 10 fois (cadre 1 sur la superposition), semble correspondre au signal de la protéine GSK3 identifié par Western blot dans la figure 32B. Cela serait parfaitement en accord avec les résultats précédemment observés dans la Figure 29C, indiquant que l'Indirubin 42 est un inhibiteur de GSK3.

Pour conclure, j'ai pu déterminer que les 4 composés testés étaient tous spécifiques, étant donné que les comparaisons entre les Essais et les Compétitions

ont révélés une quasi-totalité de signaux jaunes. Cependant, pour les composés issus des criblages ciblés, PP2 et Indirubin 42 (Figure 34A), je n'ai pas pu identifier de signal correspondant à la protéine CK1.2, ce qui est très probablement dû à une trop faible abondance de celle-ci dans mon échantillon. J'ai pu néanmoins valider l'inhibition de la protéine GSK3 par l'Indirubin 42 avec une diminution de près de 10 fois de l'intensité du signal par rapport à l'Essai. D'autre part, cette expérience n'ayant été réalisée qu'une seule fois, il est indispensable de réaliser des réplicats techniques et biologiques.

4.5. Conclusion

Finalement, notre approche combinant la chromatographie d'affinité à l'ATP avec la 2D-DiGE pour déterminer la spécificité d'un composé (compétitif de l'ATP) est innovante, efficace et très reproductible. En effet, elle permet une meilleure séparation de toutes les protéines de liaison à l'ATP, tout en simplifiant l'identification du nombre de protéines inhibées par les composés. Cette approche simple et visuelle m'a permis de valider les résultats

que j'ai pu obtenir en une dimension avec la coloration SYPRO Ruby grâce à une résolution accrue de mes protéines dans un seul et même gel. De plus, la possibilité de pouvoir analyser les résultats des différentes conditions avec le logiciel SameSpots m'a permis de valider de façon semi-quantitative les résultats observés visuellement. Donc, bien que la sensibilité de détection de cette approche ne permette pas d'identifier l'intégralité des protéines présentes dans l'ATPome, et plus particulièrement les protéines faiblement abondantes, elle permet néanmoins de déterminer la spécificité de composés et d'orienter nos décisions quant au choix des composés à optimiser. Toutefois, afin de déterminer précisément les cibles inhibées par ces composés, il sera indispensable de réaliser une analyse MS.

Discussion

Discussion & Perspectives

De nos jours, les compagnies pharmaceutiques disposent de milliers voire de millions de composés qui peuvent être utilisés dans des criblages à haut débit de plus en plus perfectionnés, mais le problème majeur qui en découle inévitablement est toujours le choix du composé qui aurait le plus de chances d'aboutir à un médicament. Pour cette raison, la déconvolution de cibles est une étape capitale dans la découverte de nouveaux médicaments quelle que soit la maladie concernée. En effet, au-delà de l'identification des cibles d'un composé, la déconvolution permet d'accéder aux mécanismes d'action des composés issus de criblages phénotypiques, mais aussi, de valider la spécificité des composés issus de criblages ciblés pour leur(s) cible(s). Cependant, aujourd'hui le manque de connaissances sur les processus pathologiques de nombreuses maladies, dont les leishmanioses, font de l'étape de déconvolution de cible une tâche ardue, nécessitant beaucoup de temps et un investissement financier conséquent, qui a peu de chance d'aboutir à un médicament efficace (Lee and Bogyo, 2013; Terstappen et al., 2007).

Dans ce contexte, les membres du consortium européen LeishDrug ont identifié et validé une dizaine de composés avec un effet anti-*Leishmania*. Certains de ces composés ont été sélectionnés pour leur efficacité contre le parasite par criblage phénotypique (HCA), et d'autres par criblage ciblé contre la Caséine kinase 1.2 de *Leishmania*. Toutefois, dans le premier cas, les cibles des composés étaient inconnues, et dans le deuxième cas, la spécificité des composés restait à établir (cibles secondaires possibles). C'est afin de pouvoir répondre à ces problématiques, que j'ai développé et appliqué une nouvelle stratégie dans le but d'identifier les cibles interagissant avec nos composés, mais aussi, une approche utilisant la protéomique pour sélectionner nos composés en fonction de leur spécificité.

Déconvolution des cibles de composés avec le « Staurosporine Capture Compound »

Ma première approche basée sur le choix d'un inhibiteur générique de kinases n'a permis d'identifier que 70 protéines, dont 23 kinases qui représentent 8% du kinome de *L. infantum*.

Ainsi, bien que la Staurosporine ait été décrite comme un inhibiteur efficace sur près de 50% du kinome humain (Karaman et al., 2008), il semblerait que ce ne soit pas le cas chez *Leishmania*. Cela pourrait être dû à une trop grande divergence entre la poche de liaison à l'ATP de *Leishmania* et celles des mammifères. En conséquence, étant donné le coût élevé de cette technologie et sa faible efficacité, cette méthode n'est pas utilisable pour la déconvolution de cibles de nos composés.

Toutefois, cette méthode m'a permis de recueillir des informations importantes sur les cibles cellulaires de la Staurosporine chez *Leishmania*. En effet, mes données ont montré que le « Staurosporine capture compound » était capable de capturer des kinases impliquées dans la motilité et la prolifération du parasite confirmant ainsi les résultats précédemment obtenus (Foucher et al., 2012). De plus, cette méthode a également permis d'annoter les protéines hypothétiques LinJ.20.0280 et LinJ.09.1630 comme étant des protéines de liaison à l'ATP (Leclercq et al., 2013).

Déconvolution des cibles de composés par chromatographie d'affinité à l'ATP

L'approche utilisant un inhibiteur générique de kinases n'ayant pas abouti, je me suis orienté vers une approche plus physiologique et moins sélective en exploitant la molécule d'ATP pour capturer l'ensemble des protéines de liaison à l'ATP (ATPome). J'ai pu établir une méthode reproductible qui permet de capturer l'intégralité des protéines de liaison à l'ATP fonctionnelles et disponibles dans un extrait protéique, et ainsi identifier près de 1200 protéines de liaison à l'ATP putatives, réalisant ainsi le premier ATPome chez les trypanosomatidés.

L'obtention du protéome de *L. donovani* m'a fourni une base de données pour identifier, analyser et comparer les protéines présentes dans l'ATPome. Dans ce protéome, nous avons pu identifier avec certitude 5031 protéines, dont 4684 dans les promastigotes et 4311 dans les amastigotes axéniques, ce qui représente près de 60% du génome et le premier répertoire, jamais réalisé, de protéines exprimées dans les deux stades du parasite.

Discussion & Perspectives

En effet, à ce jour, les protéomes les plus complets ont permis d'identifier 3696 protéines dans les promastigotes de *L. major* (Drummelsmith et al., 2003), environ 2000 protéines dans les promastigotes et les amastigotes axéniques de *L. infantum* (El Fakhry et al., 2002), et 1713 protéines dans les promastigotes et les amastigotes axéniques de *L. donovani* LD15 (Rosenzweig et al., 2008). De plus, ce nombre est très probablement sous-estimé car chez *Leishmania*, certains gènes sont organisés en tandem dont chaque copie code pour une même protéine, générant ainsi un nombre supérieur de gènes par rapport au nombre de protéines exprimées (Rogers et al., 2011).

Dans l'ATPome, j'ai identifié 1177 protéines, dont 945 dans les promastigotes et 908 dans les amastigotes axéniques, représentant près de 23% du protéome identifié (1149/5031 protéines). En 2006, une étude du purinome humain a estimé que celui-ci représentait près de 13% du génome (3266/25000 gènes) (Haystead, 2006). Dans ce purinome, près de 63% des protéines utilisent l'ATP comme substrat (ATPome), 23% le GTP, 14% le NAD/NADP et 0,2% l'adénosine. Si l'on rapporte le pourcentage de l'ATPome sur l'intégralité du génome, on peut estimer qu'il représente près de 8%, soit environ 2000 gènes (Murray and Bussiere, 2009). Donc, si je compare la proportion théorique de l'ATPome humain (8%) avec la proportion empirique de *Leishmania* (23%), je remarque que l'ATPome de *Leishmania* est 2,8 fois plus important que dans celui de l'homme. Bien que surprenant, ce chiffre élevé pourrait s'expliquer pour trois raisons :

La première est que parmi les 1200 protéines identifiées, il y a très certainement des protéines qui ont été co-purifiées via une protéine partenaire capable de lier l'ATP. En effet, dans l'ATPome, je n'ai identifié que 205 protéines annotées pour la fonction liaison à l'ATP (GO : 0005524). Il reste donc potentiellement 972 protéines qui ont pu être co-purifiées. Par exemple, j'ai pu identifier la protéine STi1 qui n'est pas une protéine de liaison à l'ATP mais qui interagit fortement avec les protéines de liaison à l'ATP HSP70 et HSP83-1 (Longshaw et al., 2004). Ainsi, il n'est pas exclu que d'autres protéines soient dans le même cas. Toutefois, le fait que l'annotation des protéines soit incomplète dans les bases de données disponibles pour *Leishmania* pose un véritable problème pour l'identification des protéines qui ont été spécifiquement capturées.

Il était donc indispensable d'analyser ces protéines manuellement avant de pouvoir conclure. De cette façon, j'ai déjà pu valider 45 protéines non annotées comme étant capable de lier l'ATP (22 kinases, 8 HSPs, 1 kinésine, 2 protéines de transport d'ATP/ADP, 1 ATPase de type V, 11 eukaryotic initiation factor ATP-dependent). Néanmoins, pour pouvoir déterminer si les protéines restantes se fixent ou non à l'ATP, il aurait été intéressant d'augmenter la concentration de NaCl dans le tampon de lavage afin de perturber les interactions protéine/protéine, et de déterminer si certaines des protéines co-purifiées pouvait être éliminées.

La deuxième raison serait la présence de protéines qui pourraient se lier à l'ATP-Agarose via l'adénine, le ribose ou le groupement phosphate. En effet, une première analyse m'a permis d'identifier 144 protéines qui pourraient avoir été capturées de cette façon (3 phosphotransférases, 11 protéines de liaison au NAD/NADH, 4 protéines de liaison au FAD/FADH, 17 phosphatases, 2 protéines de liaison à l'adénine, 13 protéines de liaison au GDP/GTP, 8 protéines de liaison à l'ADP et 86 protéines de liaison à l'ADN/ARN). Afin de valider cette hypothèse, il pourrait être intéressant de réaliser une chromatographie d'affinité en présence d'inhibiteurs de phosphatase et/ou d'autres substrats (GTP, CTP, TTP, ADP, AMP, NAD, NADH, FAD ou FADH), ou alors, de réaliser des éluions préalables avec les autres substrats afin d'obtenir uniquement les protéines de liaison à l'ATP lors de l'éluion avec l'ATP (Ito et al., 2006; Villamor et al., 2013).

Enfin, il pourrait s'agir de protéines de liaison à l'ATP spécifiques du parasite ou des trypanosomatidés qui n'existent pas chez l'homme. En effet, la protéine HRP4 (LmjF.29.1240), qui n'est présente que chez les trypanosomatidés (excepté *Trypanosoma*) (Drini et al., 2016), est présente dans l'ATPome des deux stades du parasite. De plus, des données expérimentales préliminaires réalisées dans le laboratoire semblent montrer que cette protéine est capturée par l'ATP-Agarose (Drini et al., en préparation). Il est fort probable que d'autres protéines non référencées ou hypothétiques soient dans le même cas. Aujourd'hui, la majorité des scientifiques ont tendance à ignorer ces protéines hypothétiques, générant ainsi des études basées sur un échantillon restreint du protéome qui ignore totalement une partie des mécanismes biologiques de l'organisme étudié. Ce problème ne se pose pas

Discussion & Perspectives

pour les protéomes humains ou d'organismes modèles, mais se pose essentiellement aux organismes moins étudiés comme *Leishmania*. Pour ces raisons, je me suis particulièrement intéressé aux 360 protéines hypothétiques (parmi les 782 protéines restantes) dont la fonction n'a pas encore été établie. Ces protéines représentent près de 30% des protéines de l'ATPome, et étant donné que chez *Leishmania* près de 60% des protéines n'ont pas de fonction clairement établie, il est surprenant de ne pas retrouver le même pourcentage dans l'ATPome (Ivens et al., 2005). Cela suggère que ces protéines pourraient se fixer directement à l'ATP. En effet, si ces protéines avaient été enrichies de façon indirecte, nous aurions dû retrouver un pourcentage proche de celui du protéome. Ces protéines pourraient avoir été capturées via un domaine de liaison à l'ATP connu mais pas annoté, ou alors différent de celui décrit pour les autres eucaryotes. J'ai analysé 160 de ces protéines hypothétiques avec divers outils bio-informatiques et démontré que 50% d'entre elles ont un domaine de liaison à l'ATP ou une fonction ATPase connus. Cependant, la présence d'un domaine de liaison à l'ATP, spécifique du parasite reste encore à déterminer. Cela pourrait être confirmé par l'analyse des 89 motifs identifiés par le HUB Bio-informatique et bio-statistique de l'Institut Pasteur. De plus, afin de valider expérimentalement la capacité de ces protéines hypothétiques à lier l'ATP, je suis en train de les cloner dans des vecteurs d'expression bactérien afin de pouvoir tester les protéines recombinantes par chromatographie d'affinité à l'ATP.

Malgré le nombre incertain de protéines spécifiquement capturées par cette méthode, j'ai pu identifier 80 kinases dont 7 qui n'ont pas été retrouvées dans le protéome. Cependant, il est surprenant de constater que j'ai capturé seulement 73 des 177 kinases identifiées dans le protéome. Ce faible nombre pourrait être dû à une incapacité de l'ATP-Agarose à interagir avec la poche de liaison à l'ATP de ces kinases, parce qu'elles sont soit inactives, soit en complexe. Et en effet, les résultats obtenus avec les IVKA (Figure 27) soutiennent cette hypothèse puisque toutes les kinases non capturées, restantes dans le surnageant, sont inactives. Il serait intéressant de réaliser des purifications de l'ATPome à partir d'extraits totaux réalisés à différents points de cinétique pour chacun des stades afin de voir si l'on peut retrouver des

kinases à certains stades plutôt qu'à d'autres (par exemple : inactive en phase logarithmique et active en phase stationnaire). De plus, il aurait peut-être fallu compléter la solution de liaison avec du chlorure de manganèse ($MnCl_2$) ou du chlorure de calcium ($CaCl_2$) (Ito et al., 2006) qui peuvent être requis pour l'activité de certaines kinases comme les CaM kinases. Par ailleurs, on ne peut pas exclure qu'un certain nombre de kinases n'aient qu'une faible affinité pour l'ATP, et aient été perdues lors des étapes de lavages.

Les procédures de purification d'ATPome ou de kinases deviennent des outils majeurs pour le criblage d'inhibiteurs et la déconvolution de cibles, mais, curieusement, très peu de méthodes sont actuellement disponibles. En recherchant dans la littérature, j'ai pu retrouver deux méthodes principales permettant de capturer les protéines de liaison à l'ATP ou plus spécifiquement les kinases : les « kinobeads », résine sur laquelle est immobilisé un cocktail d'inhibiteurs de kinases à large spectre (Bantscheff et al., 2007a; Bantscheff et al., 2007b; Urbaniak et al., 2012) et le ActivX™ ATP Probe, qui permet de marquer le site actif des enzymes avec une desthiobiotine (ThermoFischer Scientific) (Patricelli et al., 2007; Villamor et al., 2013; Wolfe et al., 2013). Les approches « kinobeads » et le ActivX™ ATP Probe sont des outils dont l'efficacité a été très largement prouvée sur des modèles humains, murins ou canins, avec respectivement 307 kinases identifiées dans 14 lignées cellulaires (Bantscheff et al., 2007a), et 394 kinases identifiées par plus de 4000 analyses MS (Patricelli et al., 2007). Toutefois, bien que ces chiffres paraissent impressionnants par rapport aux nôtres, ils sont le résultat d'une quantité d'expériences et d'analyses MS considérables. En effet, si l'on se cantonne à une expérience classique, les résultats sont moins spectaculaires avec plus de 800 protéines identifiées, dont environ 200 kinases, pour les « kinobeads » (Bantscheff et al., 2007a), et 136 protéines identifiées, dont 41 kinases, pour le ActivX™ ATP Probe (Patricelli et al., 2007). De plus, lorsque ces méthodes sont appliquées sur des organismes tels que les parasites, plantes ou bactéries, elles s'avèrent encore moins efficaces. Les « kinobeads » ont permis de capturer 57 kinases sur 124 identifiées dans le protéome chez *Trypanosoma brucei* (Urbaniak et al., 2012), tandis que le ActivX™ ATP Probe a permis d'identifier 24 kinases sur 1099 chez *Arabidopsis thaliana* (Villamor et al., 2013) et

Discussion & Perspectives

122 protéines de liaison à l'ATP chez *Mycobacterium tuberculosis*. Donc, si je compare ce que j'ai pu capturer, c'est-à-dire plus de 250 protéines de liaison à l'ATP incluant 80 kinases sur 178, ma procédure d'enrichissement est beaucoup plus efficace que les autres. Toutefois, pour expliquer cette différence, il faut noter que les inhibiteurs utilisés pour les « kinobeads », sont des inhibiteurs développés pour l'homme et donc potentiellement beaucoup moins efficaces sur les autres organismes. Je tiens également à souligner que, contrairement à ces méthodes, notre approche permet un enrichissement non dénaturant et non réduit de toutes les protéines de liaison à l'ATP sans modification des protéines capturées. De surcroît, l'élution des protéines est réalisée par une élution fonctionnelle native (ATP libre) qui permet d'utiliser les protéines éluées dans des tests enzymatiques.

Pour conclure, cette méthode robuste, reproductible et native m'a permis de développer une approche de déconvolution innovante qui peut aisément s'appliquer sur d'autres pathogènes ou maladies comme le cancer ou Alzheimer. En effet, la mise en concurrence d'un inhibiteur avec l'ATP-agarose m'a

permis de valider l'efficacité de plusieurs composés, dont l'Indirubin 42 pour la Caséine Kinase 1.2 et GSK3 (Figure 29). De plus, cette approche biochimique de chromatographie d'affinité à l'ATP couplée à l'analyse par 2D-DiGE m'a permis de déterminer rapidement, visuellement et de manière semi-quantitative (si nécessaire) la spécificité de divers composés. Cette approche m'a permis de valider certains de mes composés dont je suis en train de déterminer les cibles par analyse MS et permet, aujourd'hui, de choisir les composés à privilégier pour optimisation.

Annexes

Annexe 1

Annexe 1 : Liste des 70 protéines spécifiquement capturées par le SCC (Leclercq et al., 2013)

Gene name	Protein description	Stage	Fold chance (log ₂)	p-Value (-ln ₁₀)
LinJ.02.0260	Protein kinase, putative	p/a	4.59/4.58	4.15/2.10
LinJ.02.0620	Hypothetical protein, conserved	p/a	1.37/1.92	1.73/2.44
LinJ.04.0230	Hypothetical protein, conserved	p	2.10	2.51
LinJ.04.1210	tRNA nucleotidyltransferase, putative	a	2.60	2.01
LinJ.06.1220	Protein kinase, putative	p	2.72	4.29
LinJ.07.0430	Acetylmithine deacetylase-like protein	a	1.96	3.44
LinJ.07.1030	Serine/threonine kinase, putative	p	2.39	4.94
LinJ.07.1290	Hypothetical protein, conserved	a	1.26	3.28
LinJ.08.0490	Hypothetical protein, conserved	a	1.94	2.09
LinJ.09.0800	Acyl-CoA binding protein, putative	a	2.37	6.34
LinJ.09.1630	Hypothetical protein, conserved	p	inf. ^a	1.83
LinJ.10.1200	Hypothetical protein, conserved	a	1.18	1.64
LinJ.12.0880	Hypothetical protein, conserved	p	2.22	1.55
LinJ.15.0280	Sterol carrier protein, putative	a	3.70	3.43
LinJ.15.1180	Protein kinase, putative	p	inf. ^a	4.33
LinJ.15.1340	Hypothetical protein, conserved	a	1.68	2.79
LinJ.15.1630	Protein kinase, putative	a	1.74	1.75
LinJ.16.1630	Endoplasmic ret. oxidoreductin, putative	p	3.10	2.75
LinJ.17.0440	Protein kinase, putative	a	inf. ^a	1.43
LinJ.18.0850	Hypothetical protein, conserved	a	2.54	4.10
LinJ.18.1090	Protein kinase A catalytic subunit	p	3.30	4.98
LinJ.19.0130	Protein kinase, putative	p	4.62	4.28
LinJ.19.0140	Mitogen-activated protein kinase, putative	p/a	6.93/1.26	5.10/3.28
LinJ.19.0170	Mitogen activated protein kinase, putative	p	inf. ^a	2.74
LinJ.20.0280	Hypothetical protein, conserved	p	2.05	2.53
LinJ.22.0060	Hypothetical protein, conserved	p	2.07	1.46
LinJ.24.0020	Clathrin coat assembly protein, putative	a	2.04	2.09
LinJ.24.1500	NPK1-related protein kinase-like	p	9.25	2.23
LinJ.25.1800	Hypothetical protein, conserved	a	1.01	1.38
LinJ.25.2450	Serine/threonine-protein kinase, putative	p/a	5.35/2.88	4.70/3.95
LinJ.26.1610	40S ribosomal protein S33, putative	p	1.05	1.34
LinJ.27.1630	Hypothetical protein, conserved	p	1.29	2.10
LinJ.27.1920	Hypothetical protein, conserved	a	1.14	1.76
LinJ.27.2310	Hypothetical protein, conserved	p	2.77	2.41
LinJ.27.2570	Protein kinase, putative	p/a	2.04/1.8	3.49/3.84
LinJ.28.0550	Protein kinase, putative	p	inf. ^a	3.87
LinJ.28.1350	p450 reductase, putative	p	2.55	2.08
LinJ.28.2370	Glycoprotein 96-92, putative	a	8.74	2.79
LinJ.28.3140	Glutamate dehydrogenase, putative	a	1.06	1.42
LinJ.29.0350	Hypothetical protein, conserved	p	2.04	1.44
LinJ.29.0860	Cysteine peptidase C (CPC)	p/a	1.19/2.31	3.27/1.32
LinJ.29.2140	Serine/threonine protein kinase, putative	p	3.77	4.27
LinJ.30.0460	Euk. translation initiation factor 4e, putative	p	1.99	1.37
LinJ.30.0680	Hypothetical protein, conserved	a	1.69	1.62
LinJ.30.1110	Mitochondrial carrier protein-like protein	p	1.45	1.48
LinJ.30.2720	Hypothetical protein, conserved	a	1.09	1.82
LinJ.30.3330	Serine/threonine phosphatase, putative	a	1.95	1.34
LinJ.30.3510	Hypothetical protein, conserved	p	1.17	2.58
LinJ.31.2870	Hypothetical protein, unknown function	p/a	2.65/1.33	2.91/2.21
LinJ.31.3300	Protein kinase, putative	p/a	1.43/1.42	3.75/2.75
LinJ.32.1830	Pumilio/PUF RNA binding protein 7, put.	p	1.04	1.75
LinJ.32.1930	rab11B GTPase, putative	a	1.50	1.40
LinJ.32.3980	Hypothetical protein, conserved	p	1.23	1.65
LinJ.33.1350	Hypothetical protein, conserved	p/a	1.60/1.48	2.19/2.48
LinJ.34.0030	Protein kinase, putative	p/a	2.40/2.20	3.21/2.16
LinJ.34.1600	Hypothetical protein, conserved	a	1.04	1.59
LinJ.34.3930	Hypothetical protein, conserved	a	1.32	2.99
LinJ.35.0910	Hypothetical protein, conserved	p/a	1.76/1.20	3.24/2.52
LinJ.35.1070	Protein kinase, putative	p	4.68	3.33
LinJ.35.2720	Hypothetical protein, conserved	a	1.30	1.83
LinJ.35.3760	Hypothetical protein, conserved	p	3.00	2.50
LinJ.35.4010	Protein kinase A catalytic subunit isoform 2	p/a	7.62/6.29	1.90/3.96
LinJ.35.4060	Protein kinase A catalytic subunit isoform 1	p	6.09	4.76
LinJ.35.5000	Hypothetical protein, conserved	p	1.20	3.34
LinJ.36.0780	Mitogen-activated protein kinase, putative	p	2.55	2.42
LinJ.36.1850	Hypothetical protein, conserved	p	inf. ^a	1.58
LinJ.36.3540	Hypothetical protein, conserved	a	1.36	1.64
LmjF.07.1110	Hypothetical protein, conserved	a	2.03	2.74
LmjF.29.2020	Serine/threonine protein kinase, putative	a	2.60	2.11
LmjF.35.3900	Hypothetical protein, conserved	p	inf. ^a	2.96

^aRatios with infinity (inf.) value were obtained when competition was 100% resulting in division of assay values by zero.

Annexe 2

Annexe 2 : Liste des kinases capturées avec la chromatographie d'affinité à l'ATP

ID Gene	All peptides in best analysis		Description
	Pro	Ama	
LinJ.35.4050	37	49	Protein kinase, putative, MAP kinase kinase-like protein
LinJ.32.3100	16	23	Nucleoside diphosphate kinase b
LinJ.35.1720	10	7	Casein kinase II, putative
LinJ.34.0130	8	10	Adenylate kinase 2
LinJ.14.1140	7	9	Protein kinase, putative
LinJ.36.5320	7	6	Casein kinase II subunit beta, putative
LinJ.28.0140	6	-	Pantothenate kinase subunit, putative
LinJ.19.0140	5	15	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase, putative (CBPK1)
LinJ.29.2620	5	15	ATP-dependent phosphofructokinase
LinJ.04.0960	4	4	Adenylate kinase, putative
LinJ.25.2550	4	6	Tagatose-6-phosphate kinase-like protein
LinJ.27.1710	4	17	Glycosomal phosphoenolpyruvate carboxykinase, putative
LinJ.30.0940	4	7	Adenosine kinase, putative
LinJ.35.5450	4	7	Pyruvate kinase
LinJ.21.1490	3	8	Adenylate kinase, putative
LinJ.35.3210	3	5	Riboflavin kinase/fmn adenylyltransferase-like protein
LinJ.08.0520	-	3	Ribose-phosphate pyrophosphokinase, putative
LinJ.11.1000	-	41	Pyruvate phosphate dikinase, putative
LinJ.18.0270	-	9	Glycogen synthase kinase 3 (GSK3)
LinJ.20.0110	-	14	Phosphoglycerate kinase C, glycosomal (PGKC)
LinJ.20.0120	-	14	Phosphoglycerate kinase B, cytosolic (PGKB)
LinJ.21.0300	-	5	Hexokinase
LinJ.25.2450	-	5	AGC family serine/threonine kinase, putative
LinJ.29.2680	-	3	Serine/threonine-protein kinase, putative
LinJ.30.1310	-	6	Pyridoxal kinase, putative
LinJ.31.3300	-	5	Protein kinase, putative
LinJ.35.1030	-	15	Casein kinase, putative
LinJ.35.2790	-	9	Galactokinase-like protein
LinJ.35.3130	-	5	Glycerol kinase, glycosomal, putative

Gras : Protéines non annotées comme liant l'ATP dans la base de données UniProt (*L. infantum* ; GO:0005524).

Annexe 3

Annexe 3 : Liste des kinases identifiées dans les protéomes et les ATPomes

Gene	All peptides in best analysis				MW (kDa)	Description
	Proteomes		ATPome			
	Pro	Ama	Pro	Ama		
LinJ.02.0260	14	8	6	7	55,9	NIMA/Nek Serine/threonine-protein kinase family, putative, Mitogen-activated kinase kinase kinase, putative
LinJ.02.0330	23	19	5	6	44,2	Casein kinase II, alpha chain, putative
LinJ.02.0540	3	7	-	15	107,9	Protein kinase, putative
LinJ.03.0200	12	9	4	-	42,6	Protein kinase, putative
LinJ.04.0960	23	21	17	16	23,0	Adenylate kinase, putative
LinJ.05.1080	19	8	19	14	80,3	Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase, putative, MORN repeat-containing protein
LinJ.08.0520	30	28	18	28	93,8	Ribose-phosphate pyrophosphokinase, putative
LinJ.09.0460	9	13	-	3	54,3	Protein kinase, putative, kinetoplastid kinetochore protein 19, putative (kkt19)
LinJ.10.0430	14	10	6	6	61,2	Dihydroxyacetone kinase 1-like protein
LinJ.11.1000	117	160	11	37	100,9	Pyruvate phosphate dikinase, putative
LinJ.13.0160	23	8	8	5	56,2	Protein kinase A regulatory subunit, Flagellum matrix protein 458 (PKA-R)
LinJ.14.1140	21	34	24	44	113,2	Protein kinase, putative
LinJ.15.0180	-	-	-	3	80,5	Serine/threonine-protein kinase, putative, protein kinase, putative
LinJ.15.0810	24	28	19	35	72,9	Protein kinase, putative
LinJ.15.1510	12	11	3	4	48,8	Phosphomevalonate kinase protein, putative
LinJ.16.1000	3	-	14	8	52,2	Protein kinase, putative (CRK)
LinJ.18.0270	33	33	29	41	40,7	Glycogen synthase kinase 3 (GSK3)
LinJ.19.0130	27	28	44	58	68,5	Protein kinase, putative
LinJ.19.0140	34	27	32	45	30,9	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase, putative (CBPK1)
LinJ.19.0360	-	-	3	4	195,3	Protein kinase, putative
LinJ.20.0110	52	54	5	19	51,4	Phosphoglycerate kinase C, glycosomal (PGKC)
LinJ.20.0120	49	50	12	18	44,9	Phosphoglycerate kinase B, cytosolic (PGKB)
LinJ.21.0300	104	115	69	114	51,8	Hexokinase
LinJ.21.1320	16	14	-	5	34,4	Cell division protein kinase 2, cdc2-related kinase (CRK1)
LinJ.21.1490	25	15	28	20	30,0	Adenylate kinase, putative
LinJ.23.0530	12	9	-	3	36,7	SNF1-related protein kinase regulatory subunit beta, putative, 5'-AMP-activated protein kinase subunit beta, putative, AMPK subunit beta, putative (AMPKB)
LinJ.24.0220	5	6	8	11	58,0	Protein kinase, putative
LinJ.24.1500	-	-	3	-	63,9	Protein kinase, putative, NPK1-related protein kinase-like
LinJ.25.1620	9	18	-	7	94,5	Protein kinase, putative
LinJ.25.1640	-	4	-	6	58,9	Casein kinase I, putative
LinJ.25.2450	36	33	5	5	44,4	AGC family serine/threonine kinase, putative
LinJ.25.2550	5	-	16	11	33,8	Tagatose-6-phosphate kinase-like protein
LinJ.26.2540	8	5	-	4	54,4	Protein kinase, putative
LinJ.26.2740	13	13	-	5	29,0	Glutamate 5-kinase, putative
LinJ.27.1700	-	4	-	4	182,6	Protein kinase-like protein
LinJ.27.1710	77	75	24	61	58,3	Glycosomal phosphoenolpyruvate carboxykinase, putative
LinJ.27.1860	14	26	9	14	101,1	Protein kinase-like protein
LinJ.27.2420	4	9	21	30	63,2	Pprotein kinase, putative
LinJ.28.0550	-	-	3	5	34,8	Protein kinase, putative (LMAIRK)
LinJ.29.2140	19	23	10	19	88,3	5'-AMP-activated protein kinase catalytic subunit alpha, putative, AMPK subunit alpha, putative, SNF1-related protein kinase catalytic subunit alpha, putative
LinJ.29.2600	-	7	6	13	50,5	Protein kinase, putative
LinJ.29.2620	54	51	22	24	54,0	ATP-dependent phosphofructokinase

Annexe 3

LinJ.29.2680	33	39	10	5	56,3	Serine/threonine-protein kinase, putative
LinJ.29.2780	-	-	9	10	57,5	Serine/threonine-protein kinase Nek, putative
LinJ.30.0850	16	15	-	3	57,6	Rac serine-threonine kinase, putative, protein kinase, putative
LinJ.30.0940	34	29	51	55	37,1	Adenosine kinase, putative
LinJ.30.1310	30	33	32	60	33,1	Pyridoxal kinase, putative
LinJ.30.2930	8	7	-	3	43,9	Mitogen-activated protein kinase, putative (MPK5)
LinJ.30.3430	36	33	4	5	57,6	PAS-domain containing phosphoglycerate kinase, putative
LinJ.30.3640	28	22	8	15	84,6	Serine/threonine-protein kinase, putative, protein kinase, putative
LinJ.31.3070	19	9	5	-	49,9	Repressor of differentiation kinase 2, putative (RDK2)
LinJ.31.3300	24	22	14	20	48,4	Protein kinase, putative
LinJ.32.0820	-	-	3	4	125,7	Protein kinase, putative
LinJ.32.3100	31	31	31	31	16,6	Nucleoside diphosphate kinase b
LinJ.33.1470	34	32	7	14	46,7	Mitogen activated protein kinase, putative (MPK11)
LinJ.34.0030	10	9	-	3	38,3	Protein kinase, putative
LinJ.34.0120	26	22	3	5	24,4	Adenylate kinase, putative
LinJ.34.0130	12	13	12	15	26,2	Adenylate kinase 2
LinJ.34.0990	-	-	6	5	105,7	Wee1-like protein kinase, putative
LinJ.34.2680	42	38	6	7	71,6	Regulatory subunit of protein kinase a-like protein
LinJ.34.2850	7	8	5	7	100,1	Protein kinase, putative
LinJ.34.3750	108	116	6	-	296,0	Target of rapamycin kinase 3, putative (TOR3)
LinJ.34.4160	56	93	4	-	274,5	Phosphatidylinositol 3-kinase (tor2), putative (TOR2)
LinJ.35.0780	17	15	4	11	52,3	AMP-activated protein kinase, gamma regulatory subunit, SNF1-related protein kinase regulatory subunit gamma, AMPK subunit gamma (AMPKG)
LinJ.35.1020	-	5	-	12	37,2	Casein kinase I, putative
LinJ.35.1030	42	43	20	25	39,8	Casein kinase, putative
LinJ.35.1070	22	40	4	9	54,0	Protein kinase, putative
LinJ.35.1720	17	14	8	28	42,6	Casein kinase II, putative
LinJ.35.2790	39	57	6	25	53,5	Galactokinase-like protein
LinJ.35.3130	24	27	-	3	55,9	Glycerol kinase, glycosomal, putative
LinJ.35.3210	12	11	12	14	20,5	Riboflavin kinase/fmn adenylyltransferase-like protein
LinJ.35.4050	57	65	36	42	147,1	Protein kinase, putative, MAP kinase kinase-like protein
LinJ.35.5450	55	52	21	31	55,2	Pyruvate kinase
LinJ.36.0280	20	22	3	-	53,9	Xylulokinase, putative
LinJ.36.0600	13	9	8	6	35,6	Cdc2-related kinase 3, putative (CRK3)
LinJ.36.0780	11	17	5	-	50,3	Protein kinase, putative, mitogen-activated protein kinase, putative
LinJ.36.0960	17	16	-	8	87,5	SNF1-related protein kinases, putative
LinJ.36.1580	40	21	5	3	56,5	Hypothetical protein, conserved, nima-related protein kinase, putative
LinJ.36.5320	12	10	3	12	30,7	Casein kinase II subunit beta, putative
LinJ.36.6580	63	88	7	3	291,4	Target of rapamycin (TOR) kinase 1, putative (TOR1)

Annexe 4

Annexe 4 : Résultats de l'analyse des protéines hypothétiques par Protein BLAST

Gene	All peptides in best analysis		ATPome		Domains and homologies
	Pro	Ama	Pro	Ama	
LinJ.02.0120	4	5	5	14	RING-finger domain, mitochondrial ubiquitin ligase activator of NFKB 1-like [36% <i>Diuraphis noxia</i>]
LinJ.02.0550	23	29	3	16	Snf7 (family of proteins involved in protein sorting and transport from the endosome, members of the Nudix hydrolase superfamily catalyze the hydrolysis of Nucleoside Diphosphates linked to other moieties)
LinJ.03.0260	29	24	29	37	FYVE domain like superfamily, DUF3584 (P-loop), SMC, Myosin tail, COG1566 (Multidrug resistance efflux pump)
LinJ.03.0670	162	188	30	53	DEAD-like helicases superfamily, Superfamily II RNA helicase, ski2-like helicase (P-loop NTPase)
LinJ.04.0540	81	63	7	-	TPR 11 repeat (x9), tpr 16, tpr 19, putative PEP-CTERM system TPR-repeat lipoprotein, cellulose synthase subunit BcsC, Tetratricopeptide (TPR) repeat
LinJ.04.0810	9	12	12	-	Breast Cancer Suppressor Protein (BRCA1), carboxy-terminal domain
LinJ.05.0090	9	13	17	23	NUDIX hydrolase dihydroneopterin triphosphate pyrophosphohydrolase/hydrolase, putative, RNA pyrophosphohydrolase, 8-oxo-dGTP pyrophosphatase MutT and related house-cleaning NTP pyrophosphohydrolases
LinJ.05.0610	5	11	9	9	Surp module (also known as the SWAP domain)
LinJ.06.0030	62	70	12	22	WD40 domain, protein SPA1-RELATED
LinJ.07.0380	32	26	11	4	No domain
LinJ.08.0900	14	5	8	8	Dpy-30 motif, eukaryotic translation initiation factor 5B-like [35% <i>Notothenia coriiceps</i>]
LinJ.08.1010	49	41	10	18	No domain
LinJ.09.0020	9	8	9	-	WD40 domain, ribosome biogenesis protein NSA1 [67% <i>Trypanosoma grayi</i>]
LinJ.09.0120	33	34	14	27	EF-hand, calcium binding motif (A diverse superfamily of calcium sensors and calcium signal), Chromosome segregation ATPase SMC, Ca ²⁺ -binding protein, calmodulin
LinJ.09.0160	9	5	10	-	Forkhead associated domain (FHA), kinase-associated protein phosphatase, RING-finger, N1R/p28-like protein
LinJ.09.0530	-	6	-	12	Inward rectifier potassium channel, Invertebrate innate immunity transcript family
LinJ.09.0570	48	53	12	42	ELL-associated factor 1 [40% <i>Clupea harengus</i>]
LinJ.09.1070	45	43	8	6	No domain
LinJ.09.1630	3	-	12	8	BRCT domain-containing protein [43% <i>Strigomonas culicis</i>]
LinJ.11.0070	53	53	24	20	SMC prok B, DNA repair exonuclease SbcCD ATPase subunit, DUF3584 (P-loop), Transmembrane protein
LinJ.11.0410	19	17	17	-	BOP1NT (NUC169) domain, WD40 domain
LinJ.11.0820	21	19	9	6	Phosphodiesterase
LinJ.11.0930	9	11	8	10	Type II secretion system protein L, cell division protein MukB, Membrane protein involved in colicin uptake
LinJ.12.0015	12	7	8	6	Uncharacterized N-terminal domain of peptidoglycan hydrolase CwI0, SMC, AAA27, cell division protein MukB, Methyl-accepting chemotaxis-like domains, DUF3584 (P-loop)
LinJ.12.0570	-	-	4	3	JNK_SAPK-associated protein-1, SMC, Chromosome segregation ATPase, Spc7 kinetochore protein, type VI secretion ATPase, ClpV1 family, Fez1 protein, Conserved oligomeric complex COG6, Trichohyalin-plectin-homology domain, Inter-Src homology 2 (ISH2) helical domain of Class IA Phosphoinositide 3-kinase Regulatory subunits
LinJ.13.1250	30	14	22	19	Dpy-30 motif, AAA domain, P-loop, tRNA A37 N6-isopentenyltransferase MiaA, Nucleoside-diphosphate-sugar epimerase, recombination factor protein RarA/unknown domain fusion protein
LinJ.14.0460	27	31	7	11	p23_like domain of NUD (nuclear distribution) C and similar proteins, CS domain, The CS and CHORD, N-terminal conserved domain of Nudc
LinJ.14.0580	33	38	16	-	WD40 domain, Dip2/Utp12 Family, coronin
LinJ.14.1270	10	13	12	22	Ribokinase/pfkB superfamily, NAD(P)H-hydrate epimerase domain, YjeF-related protein N-terminus, YjeF-N domain, Carbohydrate kinase, pyridoxine (pyridoxamine) 5'-phosphate oxidase
LinJ.15.0080	12	6	7	-	Origin recognition complex (ORC) subunit 3 N-terminus
LinJ.15.0460	13	8	9	-	ppR repeat, excreted/secreted protein 15 [83% <i>Trypanosoma grayi</i>]
LinJ.15.0740	6	11	-	14	No domain
LinJ.15.0820	24	12	21	-	No domain
LinJ.15.1170	67	73	35	94	Effector domain of the CAP family of transcription factors; Cyclic nucleotide-binding domain, cytoskeletal protein RodZ
LinJ.15.1650	-	-	5	8	No domain
LinJ.16.0090	33	20	4	11	Galactose oxidase, central domain, Kelch motif, nitrile-specifier protein, mutatorase, YjhT family, Domain of unknown function (DUF4110)
LinJ.16.0660	8	8	9	4	heat shock protein GrpE, ATP synthase CF0 B subunit, SMC, Chromosome segregation ATPase, Autophagy protein Ap66
LinJ.16.0890	19	12	9	-	Nucleolar protein, Nop52, adenylate kinase
LinJ.16.0990	38	29	57	53	DUF3584 (P-loop), SPEC superfamily, SMC prok B
LinJ.16.1280	79	53	44	3	No domain
LinJ.17.0010	78	60	17	33	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A [23% <i>Arachis ipaensis</i>]
LinJ.17.1080	53	44	9	5	Mak10 subunit, NatC N(alpha)-terminal acetyltransferase
LinJ.17.1340	51	52	-	15	Tetratricopeptide (TPR) repeat
LinJ.18.0820	178	182	16	-	eIF-2-alpha kinase activator GCN1 [28% <i>Arachis ipaensis</i>]
LinJ.18.1150	10	14	11	13	Chromosome segregation ATPase SMC, DUF3584 (P-loop)
LinJ.18.1340	16	21	4	13	SMC, Chromosome segregation ATPase, Protein of unknown function DUF3584 (P-loop), Predicted coiled-coil domain-containing protein
LinJ.19.0230	14	25	8	-	GNL3L/Grn1 putative GTPase, Circularly permuted Ylqf-related GTPases, P-loop containing Nucleoside Triphosphate Hydrolases, Members of the P-loop NTPase domain

Annexe 4

LinJ.19.0650	78	67	29	59	DEAD-like helicases superfamily, ATP-dependent helicase (P-loop), SWAP domain
LinJ.19.0720	7	7	6	14	Chromosome segregation ATPase SMC
LinJ.20.0090	18	26	41	42	Phosphodiesterase domain of human TDP2, flagellar MS-ring protein
LinJ.21.0350	13	12	14	-	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 42-like [39% <i>Mesitornis unicolor</i>]
LinJ.21.0830	20	26	21	-	No domain
LinJ.21.0880	193	181	3	14	CCR4-Not complex component, Not1, Cell division control protein, negative regulator of transcription, Domain of unknown function (DUF3819)
LinJ.21.1390	6	-	12	5	SMC prok B, DUF3584 (P-loop)
LinJ.21.1830	45	40	10	17	No domain
LinJ.22.0006	6	10	19	19	SMC, DUF3584 (P-loop)
LinJ.22.0290	17	44	-	7	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 9 (TNFRSF9), GCC2 and GCC3
LinJ.22.0810	56	40	17	6	No domain
LinJ.22.1160	33	36	8	4	SMC, Myosin tail, Spc7 kinetochore protein
LinJ.22.1170	-	-	7	-	Flagellar motor protein PomA, chromosome segregation protein SMC, common bacterial type, SMC, Chromosome segregation ATPase
LinJ.22.1230	6	5	5	-	Mak-16-like RNA binding protein, putative
LinJ.23.0520	21	22	7	13	SMC, DNA repair exonuclease SbcCD ATPase subunit, DUF3584 (P-loop)
LinJ.23.0810	40	41	7	14	No domain
LinJ.23.1310	6	7	9	8	Leucine-rich repeat (LRR) protein (x13), Antagonist of mitotic exit network protein 1, Resistant to <i>P. syringae</i> 6, Leucine-rich
LinJ.23.1980	13	10	8	12	Nucleoside 2-deoxyribosyltransferase
LinJ.25.0430	5	7	27	34	Plasmodium histidine-rich protein (HRPII/III), SMC, K ⁺ -dependent Na ⁺ /Ca ⁺ exchanger
LinJ.25.1240	22	22	20	4	WD40 domain
LinJ.25.1660	21	-	9	-	WD40 domain repeat, Ca2+-binding protein, EF-hand superfamily
LinJ.25.1670	31	26	-	13	Phosphatidylinositol-kinase domain protein, putative [32% <i>Leishmania donovani</i>]
LinJ.25.1860	-	-	16	4	D-alanine-D-alanine ligase and related ATP-grasp enzymes, SET domains are protein lysine methyltransferase enzymes
LinJ.25.2100	37	36	8	-	Putative beta-ketoacyl acyl carrier protein [ACP] reductase (BKR)-like, cytidylate kinase, hymidylate kinase [50% <i>Ruminococcus sp.</i>]
LinJ.25.2520	104	116	66	96	DNA repair exonuclease SbcCD ATPase subunit
LinJ.26.0620	30	17	19	4	NADPH-dependent 2,4-dienoyl-CoA reductase, Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase
LinJ.26.0900	6	-	9	5	IstB-like ATP binding protein; This protein contains an ATP/GTP binding P-loop motif (P-loop_NTP); DNA replication protein DnaC, AAA - ATPases
LinJ.26.1280	29	40	11	-	No domain
LinJ.26.1790	88	115	22	-	No domain
LinJ.26.1890	-	3	3	-	Lipase (class 3), FYVE zinc finger, YOTB, Vac1, and EEA1, triacylglycerol lipase
LinJ.26.1960	87	89	13	12	Putative mitochondrial nucleolar protein (NOP86) [71% <i>Leptomonas pyrrocaris</i>]
LinJ.26.2060	4	15	-	20	Catalytic domain of the Serine/Threonine Kinase, Catalytic domain of the Serine/Threonine Kinase, Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase, Liver Kinase B1, Calmodulin Dependent, Ephrin Receptor A2, Protein kinase domain, mitogen-activated protein kinase kinase (PLN00034)
LinJ.26.2310	49	45	3	13	SMC, Chromosome segregation ATPase, Synaptonemal complex protein 1 (SCP-1)
LinJ.26.2400	115	-	4	-	Domain of unknown function (DUF4460)
LinJ.26.2590	12	-	40	21	SET domains are protein lysine methyltransferase enzymes, D-ala D-ala ligase C-terminus, D-alanine-D-alanine ligase and related ATP-grasp enzymes
LinJ.26.2690	32	36	33	44	SMC, DUF3584 (P-loop)
LinJ.27.0970	8	17	9	5	No domain
LinJ.27.1220	63	54	8	14	K homology RNA-binding domain, type I (G-X-X-G motif), helicase superfamily c-terminal domain, SAM domain of SASH1 proteins, Superfamily II DNA and RNA helicase, arCOG04150 universal archaeal KH domain protein, rRNA processing protein Krr1/Pno3
LinJ.27.1720	70	80	16	40	Leucine-rich repeats of kinetochore protein Cenp-F/LEK1, SMC prok B, AAA27 (P-loop), cell division protein MukB, Calcium binding and coiled-coil domain
LinJ.27.1800	58	35	25	7	No domain
LinJ.27.2430	16	14	4	9	Conserved, WD-repeat protein
LinJ.28.0290	23	25	17	3	WD40 domain, NET1-associated nuclear protein 1 [99 % <i>Trypanosoma grayi</i>]
LinJ.28.0380	5	7	-	16	No domain
LinJ.28.1650	-	-	12	18	SMC, DUF3584 (P-loop)
LinJ.29.0110	119	144	32	74	Zizimin proteins are atypical GTP/GDP exchange factors for the small GTPases Rac and Cdc42, C2 domains found in Dedicator Of CytoKinesis 1 (dock180), Dock Homology Region 2, a GEF domain, of Dedicator of Cytokinesis proteins
LinJ.29.0440	14	7	15	3	PPR repeat ;phosphate ABC transporter permease [40 % <i>Sphingomonas taxi</i>]
LinJ.29.1600	39	22	11	-	Nodulin-like, MFS general substrate transporter, putative
LinJ.29.1820	11	14	21	34	Brown fat-inducible thioesterase (BFIT). Brain acyl-CoA hydrolase (BACH)., Acyl-CoA hydrolase, Thioesterase superfamily
LinJ.30.0310	20	39	11	28	Outer membrane protein (OmpH-like), SMC, AAA27
LinJ.30.0670	10	6	8	-	Envelope glycoprotein E
LinJ.30.1880	8	5	17	18	AAA* (ATPases Associated with a wide variety of cellular Activities) superfamily, Broad-specificity NMP kinase, putative kinase, denylate kinase (ADK), Dephospho-CoA kinase, cytidylate kinase, putative, DNA replication protein
LinJ.30.3250	11	19	5	21	Outer membrane protein (OmpH-like), Chromosome segregation ATPase SMC, Ezrin/radixin/moesin family, Spc7 kinetochore protein
LinJ.31.0140	7	8	12	23	Outer membrane protein (OmpH-like), SMC, AAA29
LinJ.31.0210	14	15	11	-	WD repeat protein
LinJ.31.1010	23	18	21	-	No domain
LinJ.31.1060	5	-	9	6	No domain
LinJ.31.1400	16	38	-	9	Chromosome segregation ATPase, SMC, DUF3584 (P-loop), cell division protein MukB

Annexe 4

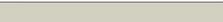
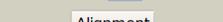
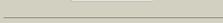
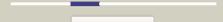
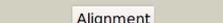
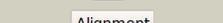
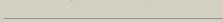
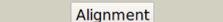
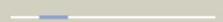
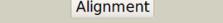
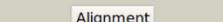
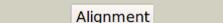
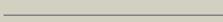
LinJ.31.1450	-	-	-	4	No domain
LinJ.31.2190	27	19	59	62	Fungal tRNA ligase phosphodiesterase domain, tRNA ligase kinase domain, oligopeptide ABC transporter ATP-binding protein OppF, tRNA splicing ligase, AAA domain (P-loop), ATP-binding protein FtsE
LinJ.31.2340	18	18	3	11	No domain
LinJ.32.0760	21	22	40	40	PKc like, Serine/Threonine protein kinases
LinJ.32.1000	93	77	10	10	Staphylococcal nuclease homologues, SNase, Tudor domain, Domain of unknown function present in several RNA-binding proteins, Endonuclease YncB, thermonuclease family
LinJ.32.2370	43	46	26	45	TATA element modulatory factor 1 TATA binding, SMC, DNA repair exonuclease SbcCD ATPase subunit, DUF3586
LinJ.32.2790	55	54	10	-	SpoU rRNA Methylase family, tRNA(Leu) C34 or U34 (ribose-2'-O)-methylase TrmL, rRNA methylase, putative, group 3
LinJ.32.3200	58	58	4	7	Conserved, leucine-rich repeat protein, putative
LinJ.32.4130	-	-	4	3	Gar1/Naf1 RNA binding region, rRNA processing protein Gar1
LinJ.33.0010	24	15	15	3	Large tegument protein UL36, cell wall hydrolase [29% <i>Bacillus</i>]
LinJ.33.0300	11	11	-	12	WD40 domain
LinJ.33.0500	-	5	10	-	No domain
LinJ.33.1910	12	8	9	6	No domain
LinJ.33.2400	26	18	8	7	Electron transport complex protein RnfC, putative kinesin K39 [36% <i>Leishmania mexicana</i>]
LinJ.33.2630	7	3	6	5	Radial spokehead-like protein, radial spoke protein Ci-RSP9 [49% <i>Trypanosoma grayi</i>]
LinJ.33.2810	29	27	-	11	Outer membrane protein (OmpH-like), SMC, DUF3584 (P-loop)
LinJ.33.3250	60	57	3	13	N-terminal Src homology 2 (SH2), Holliday-junction resolvase-like of SPT6, Transcriptional accessory protein Tex/SPT6
LinJ.34.0260	9	14	7	14	SMC, Chromosome segregation ATPase, Protein of unknown function DUF3584 (P-loop)
LinJ.34.0320	27	29	12	-	WD40 domain
LinJ.34.0760	8	-	9	-	T-complex protein 10 C-terminus ; Iron/manganese superoxide dismutases, (SODs) ; superoxide dismutase [34% <i>Bacteroides barnesi</i>]
LinJ.34.1440	7	4	34	28	N terminal of the mitochondrial ATPase BSC1, AAA ⁻ -type ATPase (P-loop), SpoVK/Ycf46/Vps4 family, replication factor C large subunit, 26S proteasome subunit P45 family
LinJ.34.2000	26	35	-	24	Glycosyl hydrolase family 65 central catalytic domain, Trehalose and maltose hydrolase, maltose phosphorylase, Beta-phosphoglucomutase or related phosphatase, HAD superfamily, beta-phosphoglucomutase family hydrolase, riboflavin kinase
LinJ.34.2350	57	46	7	27	Chromosome segregation ATPase SMC, DUF3584 (P-loop), Spc7 kinetochore protein
LinJ.34.2360	43	44	11	23	SMC, AAA27, DNA repair exonuclease SbcCD ATPase subunit, kinetoplast-associated protein-like protein
LinJ.34.2400	21	26	10	27	Protein of unknown function (DUF342), SMC, recombination and DNA strand exchange inhibitor protein, Transmembrane protein
LinJ.34.4010	-	-	-	3	C-terminal putative kinase domain of FAM20, Cellulose-complementing protein A, Cell division protein DedD
LinJ.34.4250	37	42	35	66	Cyclic nucleotide-binding protein [95% <i>Angomonas deanei</i>]
LinJ.35.0180	17	26	-	17	SMC, Chromosome segregation ATPase, RecF/RecN/SMC N terminal domain
LinJ.35.1820	41	36	47	55	Rossmann fold nucleotide-binding protein
LinJ.35.1980	42	42	10	-	U3 small nucleolar RNA-associated protein 6, contains HAT (Half-A-TPR) repeat
LinJ.35.3430	11	18	-	9	Poly A polymerase regulatory subunit (PARP_regulatory)
LinJ.35.3990	14	3	13	-	Chromosome passenger complex (CPC) protein INCENP N terminal
LinJ.35.4230	15	16	9	17	Protein of unknown function (DUF2009)
LinJ.35.4620	71	78	10	16	ET domains are protein lysine methyltransferase enzymes, Catalytic domain of the Serine/Threonine Kinase, Classical Protein Kinase C alpha; STKs
LinJ.35.4780	44	38	-	12	Molecular chaperone DnaK (HSP70), Nucleotide-binding domain of human HYOU1 and similar proteins, heat shock 70 kDa precursor protein, chaperone protein DnaK
LinJ.35.4870	25	26	11	20	Breast Cancer Suppressor Protein (BRCA1), carboxy-terminal domain, Poly [ADP-ribose] polymerase, BRCA1 C Terminus (BRCT) domain
LinJ.35.4930	9	-	6	12	Chromosome segregation ATPase SMC, DUF3584 (P-loop)
LinJ.36.0070	-	-	-	3	SAP domain; The SAP (after SAF-A/B, Acinus and PIAS) motif is a putative DNA/RNA binding, Putative DNA-binding (bihelical) motif
LinJ.36.1580	40	21	5	3	Conserved, nima-related protein kinase, putative
LinJ.36.1950	11	9	31	33	Shoulder domain of the major vault protein, Major Vault Protein repeat, Phage shock protein A, RIM-binding protein of the cytomatrix active zone
LinJ.36.2330	3	6	11	-	No domain
LinJ.36.2980	27	12	7	15	No domain
LinJ.36.3370	5	4	9	8	SMC, Calcium binding and coiled-coil domain
LinJ.36.3440	36	22	15	4	Crotonase/Enoyl-Coenzyme A hydratase superfamily, Enoyl-CoA hydratase/carnithine racemase
LinJ.36.3900	5	5	5	16	Pre-mRNA cleavage complex II protein Clp1, Predicted GTPase subunit of the pre-mRNA cleavage complex
LinJ.36.4420	32	26	18	-	WD40 domain, Utp21 specific WD40 associated putative domain, Nucleoporin Nup120/162
LinJ.36.5330	97	77	16	14	No domain
LinJ.36.5380	42	46	41	58	Kinesin motor, catalytic domain. ATPase; smc, Kinesin-like protein (Cytoskeleton), DUF392
LinJ.36.5530	-	-	3	-	Catalytic domain of the Serine/Threonine kinase, Proviral Integration Moloney virus (PIM), Forkhead N-terminal region, Protein kinase domain
LinJ.36.5890	7	9	9	11	Cdk activating kinase (CAK)/RNA polymerase II transcription initiation/nucleotide excision
LinJ.36.6150	62	70	9	3	Sigma-54-dependent Fis family transcriptional regulator [28% <i>Nisaea denitrificans</i>]
LinJ.36.6290	48	10	29	-	Shikimate kinase I, AAA domain, Adenylate kinase (ADK), bifunctional pantoate ligase/cytidylate kinase, DUF392
LinJ.36.6500	-	-	5	9	Large tegument protein UL36, putative small G-protein [37% <i>Trypanosoma grayi</i>]

Annexe 5

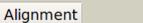
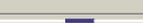
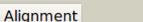
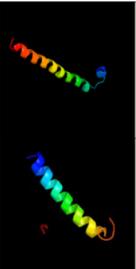
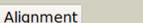
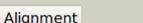
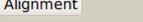
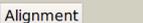
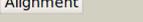
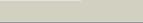
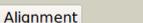
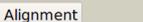
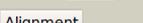
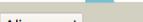
Annexe 5 : Résultats de l'analyse des protéines hypothétiques sans domaine connu avec Phyre2

Confidence : Représente la probabilité (entre 0 et 100) que la superposition entre la séquence et le modèle aient une véritable homologie. Il ne représente pas la précision attendue du modèle, même si les deux sont intimement liés. Pour une confiance > 90%, il est fort probable que la protéine est la structure représentée et que le noyau de la protéine soit modélisé avec une grande précision.

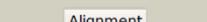
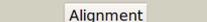
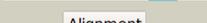
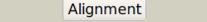
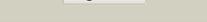
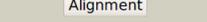
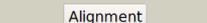
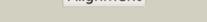
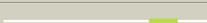
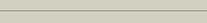
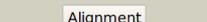
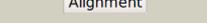
% i.d. : Pourcentage d'identité entre la séquence et le modèle (PsiBLAST). Pour les modèles de très haute précision la valeur doit être supérieure à 30%. Cependant, même si l'identité de séquence très faible (<15%) les modèles peuvent être très utiles à condition que la confiance soit élevée.

Gene	Alignment Coverage	3D Model	Confidence	% i.d.	Template Information
Linj.08.1010	 Alignment		31.9	38	PDB header: atpase inhibitor Chain: B: PDB Molecule: atpase inhibitor (mitochondrial); PDBTitle: c-terminal coiled-coil domain from bovine if1
	 Alignment	not modelled	24.3	16	Fold: Ribokinase-like Superfamily: Ribokinase-like Family: ADP-specific Phosphofructokinase/Glucokinase
	 Alignment	not modelled	7.4	13	PDB header: hydrolase Chain: K: PDB Molecule: sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium PDBTitle: cryoem model of copa, the copper transporting atpase from2 archaeoglobus fulgidus
	 Alignment	not modelled	7.2	19	Fold: ATP synthase D chain-like Superfamily: ATP synthase D chain-like Family: ATP synthase D chain-like
Linj.09.1070	 Alignment	not modelled	9.0	50	PDB header: protein binding Chain: A: PDB Molecule: membrane-associated guanylate kinase, ww and pdz PDBTitle: solution structure of the short-isoform of the second ww2 domain from the human membrane-associated guanylate kinase,3 ww and pdz domain-containing protein 1 (magi-1)
	 Alignment	not modelled	5.9	31	PDB header: transferase Chain: A: PDB Molecule: cytoplasmic tyrosine-protein kinase bmx; PDBTitle: solution structure of the btk motif of human cytoplasmic2 tyrosine-protein kinase bmx
Linj.15.0740	 Alignment	not modelled	7.4	38	Fold: Rubredoxin-like Superfamily: Casein kinase II beta subunit Family: Casein kinase II beta subunit
	 Alignment	not modelled	6.0	38	Fold: Rubredoxin-like Superfamily: Casein kinase II beta subunit Family: Casein kinase II beta subunit
Linj.15.0820	 Alignment	not modelled	6.5	46	PDB header: hydrolase Chain: J: PDB Molecule: atpase inhibitor; PDBTitle: the structure of f1-atpase inhibited by i1-60his, a2 monomeric form of the inhibitor protein, if1.
	 Alignment	not modelled	6.4	18	Fold: Obg GTP-binding protein C-terminal domain Superfamily: Obg GTP-binding protein C-terminal domain Family: Obg GTP-binding protein C-terminal domain
Linj.15.1650	 Alignment		20.9	20	PDB header: transferase/transferase inhibitor Chain: A: PDB Molecule: hexokinase-2; PDBTitle: crystal structure of human hexokinase 2 with cmpd 1, a c-2-substituted2 glucosamine
	 Alignment	not modelled	16.3	13	Fold: PreATP-grasp domain Superfamily: PreATP-grasp domain Family: Lysine biosynthesis enzyme LysX, N-terminal domain
	 Alignment	not modelled	7.8	16	PDB header: transferase Chain: D: PDB Molecule: hexokinase-3; PDBTitle: crystal structure of the c-terminal hexokinase domain of human hk3
	 Alignment	not modelled	7.7	18	Fold: Ribonuclease H-like motif Superfamily: Actin-like ATPase domain Family: Hexokinase
	 Alignment	not modelled	7.6	20	Fold: Ribonuclease H-like motif Superfamily: Actin-like ATPase domain Family: Hexokinase
Linj.16.1280	 Alignment	not modelled	30.9	27	Fold: Glycerate kinase I Superfamily: Glycerate kinase I Family: Glycerate kinase I
	 Alignment	not modelled	21.0	14	PDB header: transferase Chain: B: PDB Molecule: putative uncharacterized protein ta1305; PDBTitle: crystal structure of mevalonate-3-kinase from thermoplasma acidophilum2 (mevalonate bound)
	 Alignment	not modelled	12.8	38	PDB header: cell cycle Chain: D: PDB Molecule: cyclin-dependent kinase 5 activator 1; PDBTitle: structural mechanism for the inhibition of cdk5-p25 by2 roscovitine, aloisine and indirubin.
	 Alignment	not modelled	12.4	25	Fold: Domain of alpha and beta subunits of F1 ATP synthase-like Superfamily: Alanine racemase C-terminal domain-like Family: Eukaryotic ODC-like

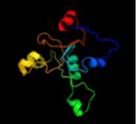
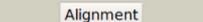
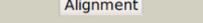
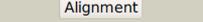
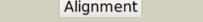
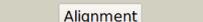
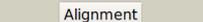
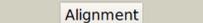
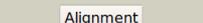
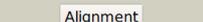
Annexe 5

Gene	Alignment Coverage	3D Model	Confidence	% i.d.	Template Information
Linj.21.0830	 Alignment	not modelled	17.2	17	Fold: Ferredoxin-like Superfamily: Nucleoside diphosphate kinase, NDK Family: Nucleoside diphosphate kinase, NDK
	 Alignment	not modelled	8.6	24	Fold: HSP33 redox switch-like Superfamily: HSP33 redox switch-like Family: HSP33 redox switch-like
	 Alignment	not modelled	8.2	48	Fold: Ferredoxin-like Superfamily: GHMP Kinase, C-terminal domain Family: Mevalonate 5-diphosphate decarboxylase
	 Alignment	not modelled	7.4	13	Fold: HSP33 redox switch-like Superfamily: HSP33 redox switch-like Family: HSP33 redox switch-like
	 Alignment	not modelled	6.9	24	Fold: HSP33 redox switch-like Superfamily: HSP33 redox switch-like Family: HSP33 redox switch-like
	 Alignment	not modelled	6.6	19	Fold: Ribosomal protein S5 domain 2-like Superfamily: Ribosomal protein S5 domain 2-like Family: GHMP Kinase, N-terminal domain
Linj.21.1830	 Alignment		14.1	20	PDB header: transferase Chain: B; PDB Molecule: serine/threonine-protein kinase 4; PDBTitle: solution structure of c-terminal domain of human mammalian2 sterile 20-like kinase 1 (mst1)
	 Alignment		13.3	41	PDB header: transferase Chain: A; PDB Molecule: sensor protein qsec; PDBTitle: backbone structure of the membrane domain of e. coli histidine kinase2 receptor qsec, center for structures of membrane proteins (csmj)3 target 4311c
	 Alignment	not modelled	9.7	17	PDB header: lyase Chain: B; PDB Molecule: phosphoenolpyruvate carboxykinase; PDBTitle: the structure of mitochondrial pepck, complex with mn and gdp
	 Alignment	not modelled	9.0	18	Fold: Carbamate kinase-like Superfamily: Carbamate kinase-like Family: N-acetyl-l-glutamate kinase
	 Alignment	not modelled	6.0	33	Fold: alpha-alpha superhelix Superfamily: ARM repeat Family: Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) helical domain
	 Alignment	not modelled	5.5	26	PDB header: ligase Chain: B; PDB Molecule: 2-succinylbenzoate--coa ligase; PDBTitle: o-succinylbenzoate coenzyme a synthetase (mene) from bacillus2 subtilis, in complex with atp and magnesium ion
	Linj.22.0810	 Alignment	not modelled	24.1	25
 Alignment		not modelled	14.5	30	Fold: Glucocorticoid receptor-like (DNA-binding domain) Superfamily: Glucocorticoid receptor-like (DNA-binding domain) Family: Type II thymidine kinase zinc finger
 Alignment		not modelled	12.1	16	PDB header: transferase Chain: C; PDB Molecule: sensor histidine kinase rese; PDBTitle: the structure of a domain of a functionally unknown protein from2 bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168
Linj.23.0810	 Alignment	not modelled	90.1	11	PDB header: hydrolase Chain: N; PDB Molecule: archaeal/vacuolar-type h+-atpase subunit i; PDBTitle: thermus thermophilus v/a-atpase, conformation 2
	 Alignment	not modelled	69.4	8	PDB header: endocytosis/exocytosis Chain: B; PDB Molecule: rab guanine nucleotide exchange factor sec2; PDBTitle: complex of the guanine exchange factor sec2p and the rab2 gtpase sec4p
	 Alignment	not modelled	46.6	17	PDB header: protein binding/transport protein Chain: C; PDB Molecule: abc-type amino acid transport system, permease component; PDBTitle: crystal structure of an amino acid abc transporter complex with2 arginines and atps
	 Alignment	not modelled	42.4	17	PDB header: endocytosis/exocytosis Chain: C; PDB Molecule: rab guanine nucleotide exchange factor sec2; PDBTitle: crystal structure of the rab gtpase sec4p, the sec2p gef2 domain, and phosphate complex
	 Alignment	not modelled	31.5	10	PDB header: hydrolase Chain: P; PDB Molecule: atp synthase f0 subcomplex c subunit; PDBTitle: atp synthase from paracoccus denitrificans
	 Alignment	not modelled	26.3	25	PDB header: transport protein Chain: C; PDB Molecule: p2x purinoceptor; PDBTitle: crystal structure of the atp-gated p2x4 ion channel in the closed, apo2 state at 3.5 angstroms (r3)

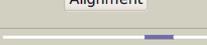
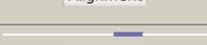
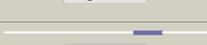
Annexe 5

Gene	Alignment Coverage	3D Model	Confidence	% i.d.	Template Information
Linj.26.1280	 Alignment		96.1	8	PDB header: transferase Chain: B; PDB Molecule: serine/threonine-protein kinase vps15; PDBTitle: structure of vps34 complex ii from <i>s. cerevisiae</i> .
	 Alignment		90.3	8	PDB header: signaling protein,protein binding Chain: A; PDB Molecule: serine/threonine-protein kinase vps15; PDBTitle: crystal structure of saccharomyces cerevisiae vps15 wd2 repeat domain
	 Alignment	not modelled	71.1	22	PDB header: transferase Chain: C; PDB Molecule: target of rapamycin complex subunit lst8; PDBTitle: structure of mtordeltan-mlst8-atp-gamma-mg complex
Linj.26.1790	 Alignment	not modelled	33.0	25	Fold: alpha-alpha superhelix Superfamily: ARM repeat Family: Regulatory subunit H of the V-type ATPase
	 Alignment	not modelled	14.2	29	PDB header: transferase Chain: C; PDB Molecule: atp:cob(i)alamin adenosyltransferase, putative; PDBTitle: crystal structure of a pduo-type atp:cobalamin adenosyltransferase2 from burkholderia thailandensis
	 Alignment	not modelled	12.6	16	PDB header: transferase Chain: B; PDB Molecule: predicted molecular chaperone distantly related to PDBTitle: nucleotide-bound open form of a putative sugar kinase2 mk0840 from methanopyrus kandleri
	 Alignment	not modelled	10.6	29	PDB header: transferase Chain: A; PDB Molecule: atp:cobalamin adenosyltransferase; PDBTitle: crystal structure of a putative pduo-type atp:cobalamin2 adenosyltransferase from mycobacterium tuberculosis
	 Alignment	not modelled	10.4	26	PDB header: transferase Chain: B; PDB Molecule: hypothetical cytosolic protein; PDBTitle: crystal structure of a pduo-type atp:cob(i)alamin adenosyltransferase2 from bacillus cereus
Linj.27.0970	 Alignment	not modelled	7.7	16	PDB header: hydrolase Chain: B; PDB Molecule: gtp cyclohydrolase-2; PDBTitle: crystal structure of gtp cyclohydrolase ii from helicobacter pylori2 26695
Linj.28.0380	 Alignment	not modelled	89.1	10	PDB header: transferase Chain: B; PDB Molecule: phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit alpha; PDBTitle: crystal structure of p110alpha in complex with ish2 of p85alpha and2 the inhibitor pik-108
	 Alignment	not modelled	88.0	9	PDB header: signaling protein/transferase/inhibitor Chain: B; PDB Molecule: phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit alpha; PDBTitle: crystal structure of p110alpha complexed with nish2 of p85alpha
	 Alignment	not modelled	86.2	12	PDB header: transferase/oncoprotein Chain: B; PDB Molecule: phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit PDBTitle: crystal structure of p110alpha h1047r mutant in complex with2 nish2 of p85alpha
	 Alignment	not modelled	86.2	8	PDB header: transferase Chain: D; PDB Molecule: rho-associated protein kinase 1; PDBTitle: crystal structure of a coiled-coil domain from human rock i
	 Alignment	not modelled	68.6	8	PDB header: transferase/oncoprotein Chain: B; PDB Molecule: phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit alpha; PDBTitle: structure of a human p110alpha/p85alpha complex
	 Alignment	not modelled	67.8	10	PDB header: endocytosis/exocytosis Chain: B; PDB Molecule: rab guanine nucleotide exchange factor sec2; PDBTitle: complex of the guanine exchange factor sec2p and the rab2 gtpase sec4p
	 Alignment	not modelled	60.1	12	PDB header: transferase Chain: B; PDB Molecule: phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit beta; PDBTitle: crystal structure of p110beta in complex with icsh2 of p85beta and2 the drug gdc-0941
	 Alignment	not modelled	57.9	11	PDB header: transferase Chain: B; PDB Molecule: phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit alpha; PDBTitle: structure of a phosphoinositide 3-kinase alpha adaptor-2 binding domain (abd) in a complex with the ish2 domain3 from p85 alpha
	 Alignment	not modelled	28.8	10	PDB header: chaperone Chain: K; PDB Molecule: proteasome-associated atpase; PDBTitle: crystal structure of the amino terminal coiled coil domain and the2 inter domain of the mycobacterium tuberculosis proteasomal atpase mpa
	 Alignment	not modelled	26.6	8	PDB header: replication Chain: B; PDB Molecule: dna double-strand break repair rad50 atpase; PDBTitle: rad50 coiled-coil zn hook
	 Alignment	not modelled	26.3	14	PDB header: transferase Chain: B; PDB Molecule: myotonin-protein kinase; PDBTitle: coiled-coil domain of dmpk
	 Alignment	not modelled	23.0	13	PDB header: protein binding Chain: B; PDB Molecule: c-jun-amino-terminal kinase-interacting protein 3; PDBTitle: crystallographic structure of the lzii fragment (anti-parallel2 orientation) from jip3

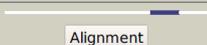
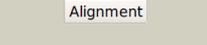
Annexe 5

Gene	Alignment Coverage	3D Model	Confidence	% i.d.	Template Information
Linj.31.1010	 Alignment		31.6	19	PDB header: hydrolase Chain: B; PDB Molecule: atp-dependent rna helicase ddx3x; PDBTitle: ddx3 helicase domain
	 Alignment		28.7	17	Fold: P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases Superfamily: P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases Family: Tandem AAA-ATPase domain
	 Alignment		20.5	18	Fold: P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases Superfamily: P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases Family: Tandem AAA-ATPase domain
	 Alignment		16.6	18	PDB header: hydrolase Chain: B; PDB Molecule: atp-dependent rna helicase dbpa; PDBTitle: structure of the second domain (residues 207-368) of the2 bacillus subtilis yxin protein
	 Alignment	not modelled	13.2	38	PDB header: metal binding protein/transferase Chain: B; PDB Molecule: myosin light chain kinase 2, skeletal/cardiac muscle; PDBTitle: the complex between ca-calmodulin and skeletal muscle myosin light2 chain kinase from combination of nmr and aqueous and contrast-matched3 saxs data
	 Alignment	not modelled	13.2	38	PDB header: calcium-binding protein Chain: B; PDB Molecule: myosin light chain kinase; PDBTitle: solution structure of a calmodulin-target peptide complex2 by multidimensional nmr
	 Alignment	not modelled	7.9	33	Fold: Ferredoxin-like Superfamily: GHMP Kinase, C-terminal domain Family: 4-(cytidine 5'-diphospho)-2C-methyl-D-erythritol kinase IspE
	 Alignment	not modelled	7.3	20	Fold: Ferredoxin-like Superfamily: GHMP Kinase, C-terminal domain Family: 4-(cytidine 5'-diphospho)-2C-methyl-D-erythritol kinase IspE
	 Alignment	not modelled	5.5	27	PDB header: transferase Chain: B; PDB Molecule: 4-diphosphocytidyl-2-c-methyl-d-erythritol PDBTitle: ternary complex of2 4-diphosphocytidyl-2-c-methyl-d-erythritol kinase
	Linj.31.1060	 Alignment	not modelled	11.4	15
Linj.31.1450	 Alignment	not modelled	11.6	64	Fold: PreATP-grasp domain Superfamily: PreATP-grasp domain Family: BC N-terminal domain-like
	 Alignment	not modelled	5.5	57	Fold: Ribonuclease H-like motif Superfamily: Actin-like ATPase domain Family: ATPase domain of dehydratase reactivase alpha subunit
Linj.31.2340	 Alignment		99.3	22	Fold: alpha-alpha superhelix Superfamily: ARM repeat Family: HspBP1 domain
	 Alignment		99.1	21	PDB header: chaperone Chain: A; PDB Molecule: hsbbp1 protein; PDBTitle: crystal structure of the hsbbp1 core domain
	 Alignment	not modelled	11.7	15	Fold: ATP-grasp Superfamily: Glutathione synthetase ATP-binding domain-like Family: Eukaryotic glutathione synthetase ATP-binding domain
	 Alignment	not modelled	11.0	32	PDB header: oxidoreductase Chain: B; PDB Molecule: nad-dependent malic enzyme; PDBTitle: molecular mechanism for the regulation of human mitochondrial2 nad(p)+-dependent malic enzyme by atp and fumarate
	 Alignment	not modelled	9.7	44	PDB header: hydrolase Chain: A; PDB Molecule: katanin p60 atpase-containing subunit a1; PDBTitle: the solution structure of n-terminal domain of microtubule severing2 enzyme
Linj.33.1910	 Alignment	not modelled	13.4	16	Fold: HAD-like Superfamily: HAD-like Family: phosphatase domain of polynucleotide kinase
	 Alignment	not modelled	8.5	50	PDB header: hydrolase Chain: D; PDB Molecule: gtp cyclohydrolase iii; PDBTitle: gtp cyclohydrolase iii from m. jannaschii (mj0145)2 complexed with gtp and metal ions

Annexe 5

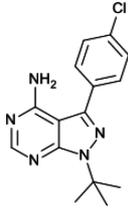
Gene	Alignment Coverage	3D Model	Confidence	% i.d.	Template Information
LinJ.36.2980	 Alignment		30.3	18	PDB header: hydrolase Chain: A; PDB Molecule: alpha-hemolysin translocation atp-binding protein hlyb; PDBTitle: a c39-like domain
	 Alignment		28.5	31	PDB header: hydrolase Chain: A; PDB Molecule: 25mer peptide from vacuolar atp synthase subunit PDBTitle: nmr structures of transmembrane segment from subunit a from2 the yeast proton v-atpase
	 Alignment		26.5	21	PDB header: transferase Chain: F; PDB Molecule: nucleoside diphosphate kinase; PDBTitle: crystal structure of nucleoside-diphosphate kinase from borrelia burgdorferi
	 Alignment		25.2	29	PDB header: transferase Chain: A; PDB Molecule: nucleoside diphosphate kinase; PDBTitle: 2.4 angstrom resolution crystal structure of putative nucleoside2 diphosphate kinase from toxoplasma gondii.
	 Alignment		22.4	25	Fold: Ferredoxin-like Superfamily: Nucleoside diphosphate kinase, NDK Family: Nucleoside diphosphate kinase, NDK
	 Alignment	not modelled	19.3	25	Fold: Ferredoxin-like Superfamily: Nucleoside diphosphate kinase, NDK Family: Nucleoside diphosphate kinase, NDK
	 Alignment	not modelled	16.2	30	Fold: beta-Grasp (ubiquitin-like) Superfamily: Staphylokinase/streptokinase Family: Staphylokinase/streptokinase
	 Alignment	not modelled	16.1	25	PDB header: transferase Chain: F; PDB Molecule: nucleoside diphosphate kinase; PDBTitle: structure and mutational analysis of a plant mitochondrial2 nucleoside diphosphate kinase: identification of residues3 involved in serine phosphorylation and oligomerization.
	 Alignment	not modelled	16.0	29	Fold: Ferredoxin-like Superfamily: Nucleoside diphosphate kinase, NDK Family: Nucleoside diphosphate kinase, NDK
	 Alignment	not modelled	16.0	17	PDB header: hydrolase Chain: A; PDB Molecule: putative abc transporter, atp-binding protein coma; PDBTitle: crystal structure of the peptidase domain of streptococcus coma, a bi-2 functional abc transporter involved in quorum sensing pathway
	 Alignment	not modelled	15.8	18	Fold: Ferredoxin-like Superfamily: Nucleoside diphosphate kinase, NDK Family: Nucleoside diphosphate kinase, NDK
	 Alignment	not modelled	15.7	25	PDB header: transferase Chain: J; PDB Molecule: nucleoside diphosphate kinase; PDBTitle: structure of leishmania ndkb complexed with amp.
	 Alignment	not modelled	15.1	18	PDB header: transferase Chain: A; PDB Molecule: nucleoside diphosphate kinase family protein; PDBTitle: crystal structure of nucleoside diphosphate kinase family protein from2 babesia bovis
	 Alignment	not modelled	14.3	38	PDB header: membrane protein Chain: A; PDB Molecule: transmembrane helix 7 of yeast vatpase; PDBTitle: solution structure of tm7 bound to dpc micelles
	 Alignment	not modelled	11.7	22	PDB header: transferase Chain: A; PDB Molecule: nucleoside diphosphate kinase; PDBTitle: crystal structure of pndk from bacillus anthracis
	 Alignment	not modelled	11.6	12	Fold: Pyruvate kinase C-terminal domain-like Superfamily: PK C-terminal domain-like Family: MTH1675-like
	 Alignment	not modelled	10.9	31	PDB header: transport protein Chain: X; PDB Molecule: 25 meric peptide from v-type proton atpase PDBTitle: structure of a peptide derived from h+-v-atpase subunit a

Annexe 5

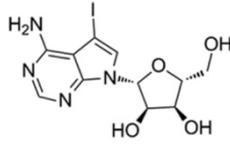
Gene	Alignment Coverage	3D Model	Confidence	% i.d.	Template Information
LinJ.33.0500	 Alignment		15.9	36	Fold: ATP-grasp Superfamily: Glutathione synthetase ATP-binding domain-like Family: Eukaryotic glutathione synthetase ATP-binding domain
	 Alignment	not modelled	6.9	16	PDB header: signaling protein, lyase Chain: D; PDB Molecule: phosphoenolpyruvate carboxykinase [gtp] PDBTitle: structure of a gtp-dependent bacterial pep-carboxykinase2 from corynebacterium glutamicum
	 Alignment	not modelled	6.9	36	Fold: Bromodomain-like Superfamily: alpha-ketoacid dehydrogenase kinase, N-terminal domain Family: alpha-ketoacid dehydrogenase kinase, N-terminal domain
	 Alignment	not modelled	5.7	24	Fold: Bromodomain-like Superfamily: alpha-ketoacid dehydrogenase kinase, N-terminal domain Family: alpha-ketoacid dehydrogenase kinase, N-terminal domain
	 Alignment	not modelled	5.1	36	Fold: ATP-grasp Superfamily: Glutathione synthetase ATP-binding domain-like Family: Eukaryotic glutathione synthetase ATP-binding domain
LinJ.36.2330	 Alignment	not modelled	5.1	30	PDB header: unknown function Chain: B; PDB Molecule: putative atp/gtp binding protein; PDBTitle: the 2.6 angstrom crystal structure of chbp, the cif homologue from2 burkholderia pseudomallei
LinJ.36.5330	 Alignment	not modelled	38.6	19	Fold: GroEL equatorial domain-like Superfamily: GroEL equatorial domain-like Family: GroEL chaperone, ATPase domain
	 Alignment	not modelled	25.5	7	PDB header: transferase Chain: B; PDB Molecule: sensor protein; PDBTitle: the crystal structure of the hpt domain from the hpt sensor hybrid2 histidine kinase from shewanella to 1.80a
	 Alignment	not modelled	22.1	18	Fold: GroEL equatorial domain-like Superfamily: GroEL equatorial domain-like Family: GroEL chaperone, ATPase domain
	 Alignment	not modelled	20.9	29	PDB header: transferase Chain: C; PDB Molecule: small membrane a-kinase anchor protein; PDBTitle: crystal structure of smakp akb domain bound ria dimerization/docking2 (d/d) complex at 2.0 a resolution
	 Alignment	not modelled	17.7	19	PDB header: chaperone Chain: B; PDB Molecule: tnf receptor-associated protein 1; PDBTitle: structure of mitochondrial hsp90 (trap1) with adp-bef3
	 Alignment	not modelled	17.5	21	PDB header: chaperone Chain: B; PDB Molecule: endoplasmic homolog; PDBTitle: crystal structure of the n-terminal domain of an hsp90 from plasmodium2 falciparum, pf11070c in the presence of a thienopyrimidine derivative
	 Alignment	not modelled	17.1	24	PDB header: chaperone Chain: D; PDB Molecule: chaperone protein htpg; PDBTitle: crystal structure of full-length htpg, the escherichia coli2 hsp90, bound to adp
	 Alignment	not modelled	13.1	19	PDB header: transferase Chain: A; PDB Molecule: putative polyphosphate kinase 2; PDBTitle: crystal structure of putative polyphosphate kinase 2 from2 sinorhizobium meliloti

Annexe 6 : Structure des composés issus des criblages ciblés et phénotypiques

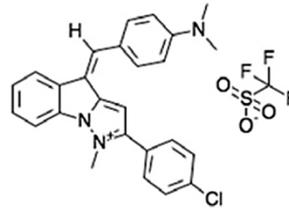
A. Composés issus des criblages ciblés



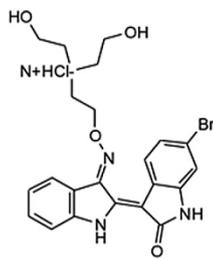
PP2



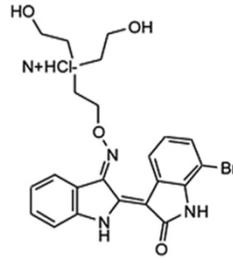
5' Iodotubercidin



NSC699479

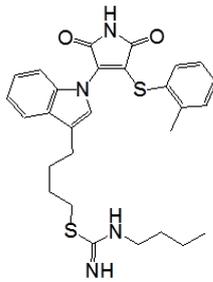


Indirubin 42

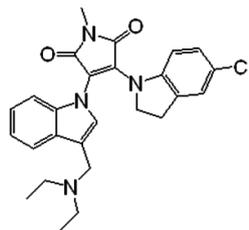


Indirubin 1530

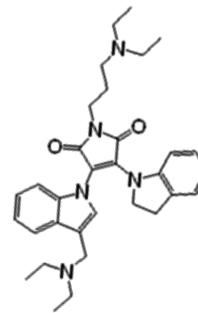
B. Composés issus des criblages phénotypiques



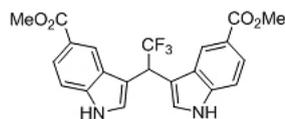
LCTA 1851



LCTA 2340



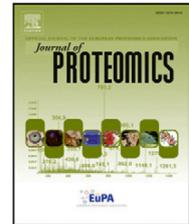
LCTA 1262



ROSC004-A07

Available online at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/jprot

Technical note

Enrichment of *Leishmania donovani* ATP-binding proteins using a staurosporine capture compound

Olivier Leclercq^{a,1}, Kathrin Bartho^{b,1}, Erik Duelsner^{b,1,2}, Lisa von Kleist^{b,1},
 Pier Federico Gherardini^{c,3}, Antonio Palmeri^c, Manuela Helmer-Citterich^c,
 Sabine Baumgart^{b,4}, Gerald F. Späth^{a,*}

^aInstitut Pasteur, and CNRS URA2581, Department of Parasitology and Mycology, Unité de Parasitologie Moléculaire et Signalisation, Paris, France

^bCaprotec Bioanalytics GmbH, Berlin, Germany

^cCentre for Molecular Bioinformatics, Department of Biology, University of Rome Tor Vergata, Via della Ricerca Scientifica, Rome, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 March 2013

Accepted 1 May 2013

Available online 16 May 2013

Keywords:

Leishmania donovani

Capture Compound

Mass Spectrometry

Staurosporine

Protein kinase

ABSTRACT

Trypanosomatid parasites of the genus *Leishmania* cause severe human diseases collectively termed leishmaniasis. Parasite ATP-binding proteins have emerged as potent targets for chemotherapeutic intervention. However, many parasite-specific ATP-binding proteins may escape current efforts in drug target identification, validation and deconvolution due to the lack of sequence conservation and functional annotation of these proteins in early branching eukaryotic trypanosomatids. Here, we selectively enriched for ATP-binding proteins from *Leishmania donovani* axenic promastigote and amastigote total protein extracts utilizing a Capture Compound™ (CC) linked to the ATP-competitive inhibitor staurosporine. As judged by in-gel kinase activity assay and competitive inhibition with free staurosporine, the CC specifically enriched for parasite phosphotransferases. Comparative nanoLC-MSⁿ analysis identified 70 captured proteins, including 24 conserved protein kinases, and 32 hypothetical proteins with potential ATP-binding function. We identified conserved signature sequence motifs characteristic for staurosporine-binding protein kinases, and identified the hypothetical proteins LinJ.20.0280 and LinJ.09.1630 as novel ATP-binding proteins. Thus, functional enrichment procedures such as described here, combined with bio-informatics analyses and activity assays, provide powerful tools for the discovery of parasite-specific ATP-binding proteins that escape homology-based identification, which can be subsequently targeted for pharmacological intervention.

Biological significance

Functional enrichment using a Capture Compound™ linked to the ATP-competitive inhibitor staurosporine provides a powerful new tool for the discovery of parasite-specific

* Corresponding author at: 25–28 rue du Dr. Roux, 75724 Paris Cedex 15, France. Tel.: +33 1 40 61 38 58; fax: +33 1 40 61 33 32.

E-mail address: gerald.spaeth@pasteur.fr (G.F. Späth).

¹ These authors contributed equally to this work.

² Current address: Fresenius Medical Care Deutschland GmbH, International Marketing & Medicine, Else-Kröner-Straße 1, 61352 Bad Homburg v.d.H., Germany.

³ Current address: Baxter Laboratory for Stem Cell Biology, Department of Microbiology & Immunology, Stanford University School of Medicine, Stanford, California, USA.

⁴ Current address: German Rheumatism Research Center, Department Immunomonitoring, Charitéplatz 1, 10117 Berlin, Germany.

ATP-binding proteins that escape homology-based identification, which can be subsequently targeted for pharmacological intervention.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The analysis of complex protein mixtures by proteomic approaches, including two-dimensional (2D) gel electrophoresis, affinity chromatography, and mass spectrometry, has established in recent years important correlations between protein abundance and cellular phenotypes, thus allowing important insight into cellular differentiation and the transition from healthy to diseased tissue [1–9]. However, these approaches have inherent limitations in the analysis of complex samples. For example, classical proteomic techniques are not capable to monitor protein interactions or to inform on enzymatic activities associated with the separated proteins. Development of such functional proteomic techniques is relevant to follow the dynamics of enzymatic reactions across various biological conditions and to assign function to largely understudied hypothetical proteins. For instance, the genomes of early branching eukaryotic pathogens of the genus *Leishmania* spp. contain over 40% of predicted hypothetical proteins, many of which have been shown to be expressed by transcriptomic and proteomic approaches [10–16]. These proteins escape bio-informatics annotation due to the absence of conserved domains and the lack of homology to experimentally characterized proteins of other organisms. Conceivably, these proteins are likely implicated in highly parasite-specific biological functions and may either have unique enzymatic activities, or carry classical enzymatic activity in the absence of conserved

primary or secondary structures. Both possibilities define hypothetical proteins as prime targets for drug development. In order to gain insight into *Leishmania* ATP-binding proteins, we previously developed an activity-based proteomic method combining 2D gel electrophoresis with in-gel kinase assay, which allowed us to identify *Leishmania* proteins with putative ATPase and phosphotransferase activities [17]. Here we applied Capture Compound Mass Spectrometry (CCMS) as an alternative strategy to isolate and identify proteins with similar activities through their interaction with staurosporine, a prototype ATP-competitive kinase inhibitor.

2. Results and discussion

The commercially available staurosporine Capture Compound™ (CC, caprotec bioanalytics GmbH, Berlin, Germany) is a tri-functional molecule that allows (i) reversible affinity interaction between staurosporine as selectivity function and specific target proteins, (ii) covalent cross-linking of the targets through the photo-activated phenyl azide moiety as reactivity function, and (iii) affinity-enrichment of the captured protein conjugates through biotin as sorting function using streptavidin magnetic beads (Fig. S1) [18]. We first assessed binding reaction and enrichment for protein kinase activities from *Leishmania donovani* axenic promastigote and axenic amastigote extracts by SDS-PAGE and in-gel kinase

Fig. 1 – (A) SDS-PAGE analysis. *Leishmania donovani* axenic promastigotes (Pro) or amastigotes (Ama) from logarithmic culture were washed once in cold PBS, resuspended in 1 mL of lysis buffer (50 mM Hepes pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 100 μM Sodium fluoride, 5 mM β-glycerophosphate disodium, 10 mM sodium pyrophosphate and 1% TRITON X-100), sonicated for 5 min (10 s on–20 s off), and centrifuged at 12,000 ×g for 10 min. The supernatants were recovered and used for the assay. The capture assay was performed in the absence (A) or presence of free staurosporine for competition (C) according to the manual of the Stauro caproKit™ (OffBead protocol, caprotec bioanalytics GmbH, Berlin, Germany). Capture beads were resuspended in 20 μL 2× Laemmli buffer, heated for 10 min at 95 °C, and separated on Novex NuPAGE 4–12% Bis Tris gel (Life Technologies). The gels were stained with SYPRO Ruby Protein Gel Stain (Life Technologies) and proteins were revealed by scanning using a Typhoon Imager (GE Healthcare). Molecular weight of standard proteins is indicated. The results shown are representative of two independent analyses. The open arrow heads point out bands that were competed in the presence of free staurosporine. *, streptavidin. (B) In-Gel Kinase Assay (IGKA). Axenic promastigote (Pro) and amastigote (Ama) cell extracts were prepared and capture assay was performed as described above. Untreated extracts (input, I), and capture beads in the absence (assay, A) or presence of free staurosporine competitor (C) were resuspended in 100 μL ultra pure water and an aliquot of 20 μL was separated on 10% acrylamide gels. Gels were fixed overnight in 50 mM Tris–HCl pH 8 and 20% isopropanol, equilibrated for 60 min in 50 mM Tris–HCl pH 8 and 1 mM DTT, denaturated for 60 min in 50 mM Tris–HCl pH 8, 20 mM DTT, 1 mM EDTA, 6 M guanidine hydrochlorid, and renaturated overnight in 50 mM Tris–HCl pH 8, 5 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.04% Tween 20. Gels were then washed for 60 min in kinase buffer (40 mM HEPES pH 7.4, 1 mM DTT, 10 mM MnCl₂, 20 mM Glycerol 2-phosphate, 100 μM Na-orthovanadate, 0.04% Tween 20) and in-gel kinase reaction was subsequently carried out by incubation of the gels for 60 min in kinase buffer containing 100 μCi γ³²P-ATP. Non-incorporated γ³²P-ATP was removed by washing five times for 60 min in 5% trichloroacetic acid, 1% Na- pyrophosphate decahydrate. Gels were stained by Coomassie (lower panel), dried and exposed for autoradiography (upper panel). Molecular weight of standard proteins is indicated. The results shown are representative of two independent analyses. *, streptavidin. (C) Venn diagrams summarizing the results of the LC-MSⁿ analysis of capture experiments using three independent axenic promastigote (Pro) and amastigote (Ama) total protein extracts. (D) Venn diagram of axenic amastigote (ama) and promastigote (pro) specific proteins (left panel), and pie chart of annotated proteins (right panel).

assay [17]. The binding reaction was performed in a volume of 100 μ L in 1 \times capture buffer provided by the kit (caprotec bioanalytics GmbH, Berlin, Germany) containing 1.75 mg/mL of total protein extracts and 5 μ M staurosporine CC. For preparative assays, endogenously biotinylated proteins were removed from the protein extracts by pre-incubation with streptavidin magnetic beads for 60 min. Following incubation for 60 min at 4 $^{\circ}$ C on a rotating wheel, samples were

irradiated at 310 nm for 10 min under cooling conditions using a UV cross-linking device (caproBoxTM, caprotec bioanalytics GmbH, Berlin, Germany), 50 μ L of streptavidin magnetic beads was added and the biotinylated protein conjugates were isolated using a magnetic stand (caproMagTM, caprotec bioanalytics GmbH, Berlin). Parallel to the assay samples, free staurosporine was added as competitor to control samples 30 min prior to addition of CC to distinguish specific

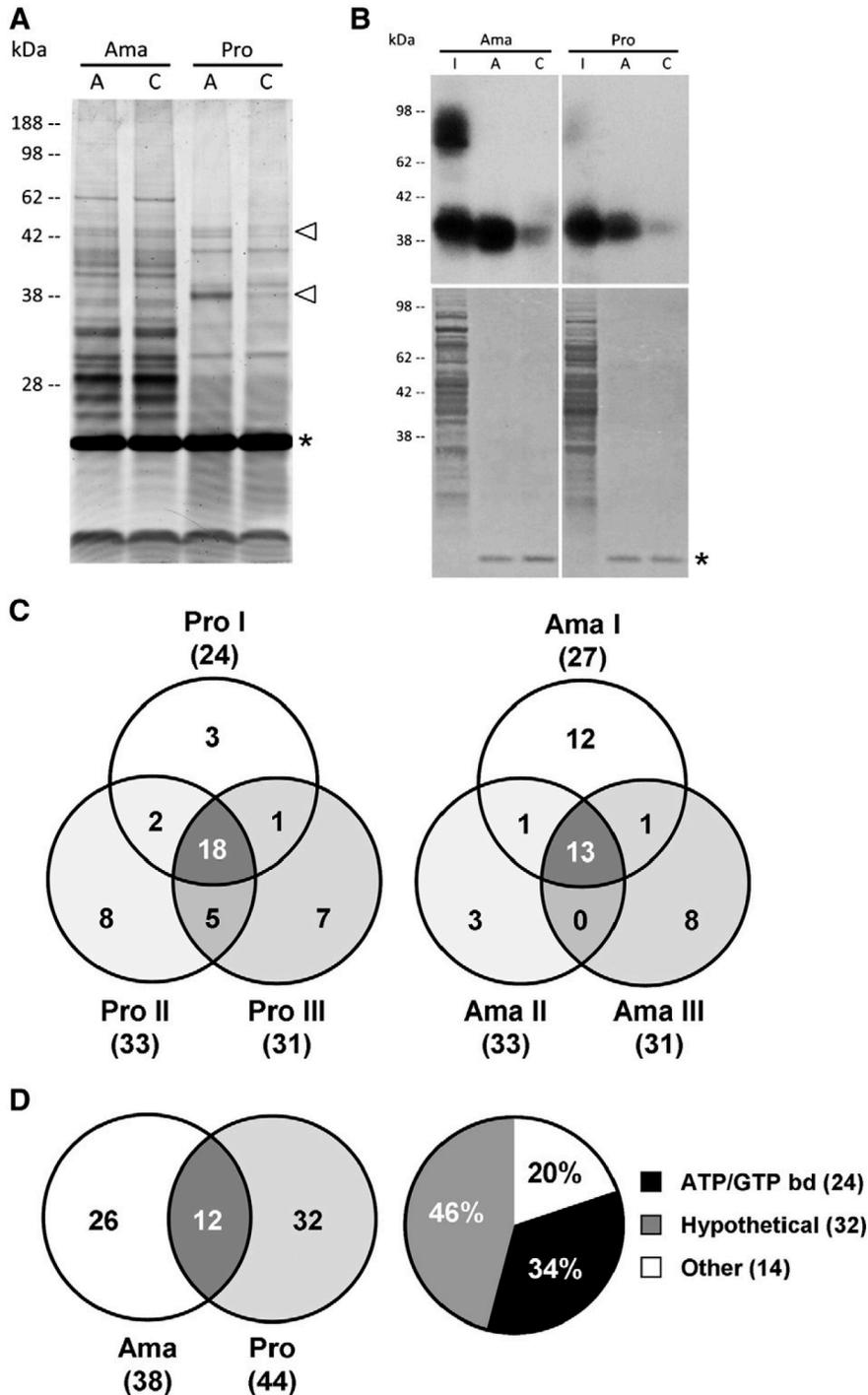


Table 1 – Staurosporine-binding proteins identified by CCMS in *L. donovani* promastigote (p) and axenic amastigote (a) total protein extracts.

Gene name	Protein description	Stage	Fold change (log ₂)	p-Value (-ln ₁₀)
LinJ.02.0260	Protein kinase, putative	p/a	4.59/4.58	4.15/2.10
LinJ.02.0620	Hypothetical protein, conserved	p/a	1.37/1.92	1.73/2.44
LinJ.04.0230	Hypothetical protein, conserved	p	2.10	2.51
LinJ.04.1210	tRNA nucleotidyltransferase, putative	a	2.60	2.01
LinJ.06.1220	Protein kinase, putative	p	2.72	4.29
LinJ.07.0430	Acetylornithine deacetylase-like protein	a	1.96	3.44
LinJ.07.1030	Serine/threonine kinase, putative	p	2.39	4.94
LinJ.07.1290	Hypothetical protein, conserved	a	1.26	3.28
LinJ.08.0490	Hypothetical protein, conserved	a	1.94	2.09
LinJ.09.0800	Acyl-CoA binding protein, putative	a	2.37	6.34
LinJ.09.1630	Hypothetical protein, conserved	p	inf. ^a	1.83
LinJ.10.1200	Hypothetical protein, conserved	a	1.18	1.64
LinJ.12.0880	Hypothetical protein, conserved	p	2.22	1.55
LinJ.15.0280	Sterol carrier protein, putative	a	3.70	3.43
LinJ.15.1180	Protein kinase, putative	p	inf. ^a	4.33
LinJ.15.1340	Hypothetical protein, conserved	a	1.68	2.79
LinJ.15.1630	Protein kinase, putative	a	1.74	1.75
LinJ.16.1630	Endoplasmic ret. oxidoreductin, putative	p	3.10	2.75
LinJ.17.0440	Protein kinase, putative	a	inf. ^a	1.43
LinJ.18.0850	Hypothetical protein, conserved	a	2.54	4.10
LinJ.18.1090	Protein kinase A catalytic subunit	p	3.30	4.98
LinJ.19.0130	Protein kinase, putative	p	4.62	4.28
LinJ.19.0140	Mitogen-activated protein kinase, putative	p/a	6.93/1.26	5.10/3.28
LinJ.19.0170	Mitogen activated protein kinase, putative	p	inf. ^a	2.74
LinJ.20.0280	Hypothetical protein, conserved	p	2.05	2.53
LinJ.22.0060	Hypothetical protein, conserved	p	2.07	1.46
LinJ.24.0020	Clathrin coat assembly protein, putative	a	2.04	2.09
LinJ.24.1500	NPK1-related protein kinase-like	p	9.25	2.23
LinJ.25.1800	Hypothetical protein, conserved	a	1.01	1.38
LinJ.25.2450	Serine/threonine-protein kinase, putative	p/a	5.35/2.88	4.70/3.95
LinJ.26.1610	40S ribosomal protein S33, putative	p	1.05	1.34
LinJ.27.1630	Hypothetical protein, conserved	p	1.29	2.10
LinJ.27.1920	Hypothetical protein, conserved	a	1.14	1.76
LinJ.27.2310	Hypothetical protein, conserved	p	2.77	2.41
LinJ.27.2570	Protein kinase, putative	p/a	2.04/1.8	3.49/3.84
LinJ.28.0550	Protein kinase, putative	p	inf. ^a	3.87
LinJ.28.1350	p450 reductase, putative	p	2.55	2.08
LinJ.28.2370	Glycoprotein 96-92, putative	a	8.74	2.79
LinJ.28.3140	Glutamate dehydrogenase, putative	a	1.06	1.42
LinJ.29.0350	Hypothetical protein, conserved	p	2.04	1.44
LinJ.29.0860	Cysteine peptidase C (CPC)	p/a	1.19/2.31	3.27/1.32
LinJ.29.2140	Serine/threonine protein kinase, putative	p	3.77	4.27
LinJ.30.0460	Euk. translation initiation factor 4e, putative	p	1.99	1.37
LinJ.30.0680	Hypothetical protein, conserved	a	1.69	1.62
LinJ.30.1110	Mitochondrial carrier protein-like protein	p	1.45	1.48
LinJ.30.2720	Hypothetical protein, conserved	a	1.09	1.82
LinJ.30.3330	Serine/threonine phosphatase, putative	a	1.95	1.34
LinJ.30.3510	Hypothetical protein, conserved	p	1.17	2.58
LinJ.31.2870	Hypothetical protein, unknown function	p/a	2.65/1.33	2.91/2.21
LinJ.31.3300	Protein kinase, putative	p/a	1.43/1.42	3.75/2.75
LinJ.32.1830	Pumilio/PUF RNA binding protein 7, put.	p	1.04	1.75
LinJ.32.1930	rab11B GTPase, putative	a	1.50	1.40
LinJ.32.3980	Hypothetical protein, conserved	p	1.23	1.65
LinJ.33.1350	Hypothetical protein, conserved	p/a	1.60/1.48	2.19/2.48
LinJ.34.0030	Protein kinase, putative	p/a	2.40/2.20	3.21/2.16
LinJ.34.1600	Hypothetical protein, conserved	a	1.04	1.59
LinJ.34.3930	Hypothetical protein, conserved	a	1.32	2.99
LinJ.35.0910	Hypothetical protein, conserved	p/a	1.76/1.20	3.24/2.52
LinJ.35.1070	Protein kinase, putative	p	4.68	3.33
LinJ.35.2720	Hypothetical protein, conserved	a	1.30	1.83
LinJ.35.3760	Hypothetical protein, conserved	p	3.00	2.50
LinJ.35.4010	Protein kinase A catalytic subunit isoform 2	p/a	7.62/6.29	1.90/3.96
LinJ.35.4060	Protein kinase A catalytic subunit isoform 1	p	6.09	4.76
LinJ.35.5000	Hypothetical protein, conserved	p	1.20	3.34

Table 1 (continued)

Gene name	Protein description	Stage	Fold chance (log ₂)	p-Value (–ln ₁₀)
LinJ.36.0780	Mitogen-activated protein kinase, putative	p	2.55	2.42
LinJ.36.1850	Hypothetical protein, conserved	p	inf. ^a	1.58
LinJ.36.3540	Hypothetical protein, conserved	a	1.36	1.64
LmjF.07.1110	Hypothetical protein, conserved	a	2.03	2.74
LmjF.29.2020	Serine/threonine protein kinase, putative	a	2.60	2.11
LmjF.35.3900	Hypothetical protein, conserved	p	inf. ^a	2.96

^aRatios with infinity (inf.) value were obtained when competition was 100% resulting in division of assay values by zero.

(competed) from non-specific enrichment (Fig. S1). We then analyzed an aliquot of the isolated capture beads by SDS-PAGE and visualized the resolved protein bands after SYPRO Ruby fluorescent staining (Life Technologies) on a Typhoon imager (GE Healthcare). Qualitative and quantitative differences were observed between the resolved protein patterns of the axenic amastigote and the promastigote extracts (Fig. 1A). As non-specific binding during cross-linking is a common phenomenon, only few protein bands showed efficient competition. Furthermore, most of specific binders, i.e. protein kinases, are likely very low in abundance and thus may not be revealed by the staining. To increase the resolution of our analysis and evaluate the enrichment potential of the assay, we next monitored specific protein kinase activities by in-gel kinase assay. Total extracts or CC-isolated proteins from axenic amastigotes and promastigotes in the absence or presence of free staurosporine were resolved by SDS-PAGE, in-gel kinase assay was performed using γ -³²P-ATP as described [17] and detailed in the legend of Fig. 1B, proteins were visualized by Coomassie staining, and protein kinase activities were revealed by autoradiography after gel drying. As previously described [17], distinct signals were detected between 30 and 100 kDa in axenic amastigotes, and between 30 and 40 kDa in axenic promastigotes, confirming the presence of stage-specific proteins with phospho-transferase activity (Fig. 1B, upper panel). The CC assay was able to specifically capture the low molecular weight signals, which likely represent auto-phosphorylating protein kinases, while the high molecular weight signals were not retained, corresponding to phosphotransferases that do not bind staurosporine (e.g. auto-phosphorylating heat shock proteins). Significantly, all captured activities were strongly reduced in the presence of free staurosporine thus validating the capacity of the CC approach to specifically isolate staurosporine-binding proteins with phosphotransferase activity. No protein bands were detected by Coomassie staining in the CC-enriched samples, confirming the low abundance of staurosporine-binding proteins in *Leishmania* that are below detection limits despite efficient enrichment (Fig. 1B, lower panel).

We next used a comparative LC-MS/MS approach to identify proteins that were specifically captured from three independent biological samples of each parasite stage. Standardized nanoLC-MSⁿ analyses of all experiments were carried out on an Ultimate 3000 HPLC system (Thermo Fisher Scientific) directly coupled to a LTQ Orbitrap Velos mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific). In all runs the standard top20 method was used to generate the raw data. A comprehensive analysis was completed using label-free quantification with the MaxQuant software package analyzing the MS intensities of precursor

signals of the peptides. Across three independent biological samples of axenic promastigotes (Pro I/II/III) and amastigotes (Ama I/II/III) a total of 1301 and 1329 captured proteins were identified, with respectively 44 and 38 proteins passing our significance criteria, i.e. showing a fold change ≥ 2 and a p-value ≤ 0.05 between capture assay and competition control using a FDR of 1% (Fig. 1C and D). Across both stages, a non-redundant set of 70 specifically captured proteins was identified (Table 1), with 26 out of 38 specific to axenic amastigotes, 32 out of 44 specific to axenic promastigotes, and 12 identified in both stages (Fig. 1D, left panel). The 70 identified captured proteins included 24 specific ATP/GTP binders and 32 hypothetical proteins with putative ATP-binding activity (Fig. 1D, right panel). Captured proteins from axenic amastigote and promastigote extracts that were efficiently competed by free staurosporine are shown in Table 1.

We next applied a series of bio-informatics approaches to assess specificity and efficiency of our assay. First, we performed a functional enrichment analysis with the data set using the controlled vocabulary of the gene ontology (GO) database. The GO annotation for the *L. infantum* proteome was downloaded from TriTrypDB and the functional enrichment analysis was performed using the BiNGO plugin [19] of the Cytoscape software package [20] using the entire annotated proteome (3620 proteins) as background. GO terms with a p-value < 0.05 after False Discovery Rate Correction were considered significant. This analysis revealed a highly significant over-representation of proteins with ATP-binding and protein kinase function, thus validating the specificity of our enrichment procedure (Fig. 2A).

Second, we combined multiple sequence alignment and motif-search algorithms to estimate the number of staurosporine-binding protein kinases in the *Leishmania* kinome with the aim to evaluate the efficiency of the capture assay. Based on available structural information of 48 protein kinases co-crystallized with staurosporine (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>; November 21st 2012), we established a non-redundant (sequence identify $< 60\%$) list of 51 staurosporine-binding proteins, which allowed the identification of 10 putative staurosporine motifs using the MEME software package ([21], e-value $< 1e-5$; Table S1). After multiple sequence alignment (t-coffee, [22]), six motifs were selected based on their proximity (distance $< 5 \text{ \AA}$) to the staurosporine molecule in the published kinase-inhibitor structures. We then assessed the predictive power of these motifs in identifying staurosporine binding kinases. Each possible combination of the 6 selected motifs was assessed on a test set of 253 human protein kinases that were previously analyzed for their inhibition by staurosporine [23]. We classified the kinases as staurosporine binding if the tested motifs were found in their

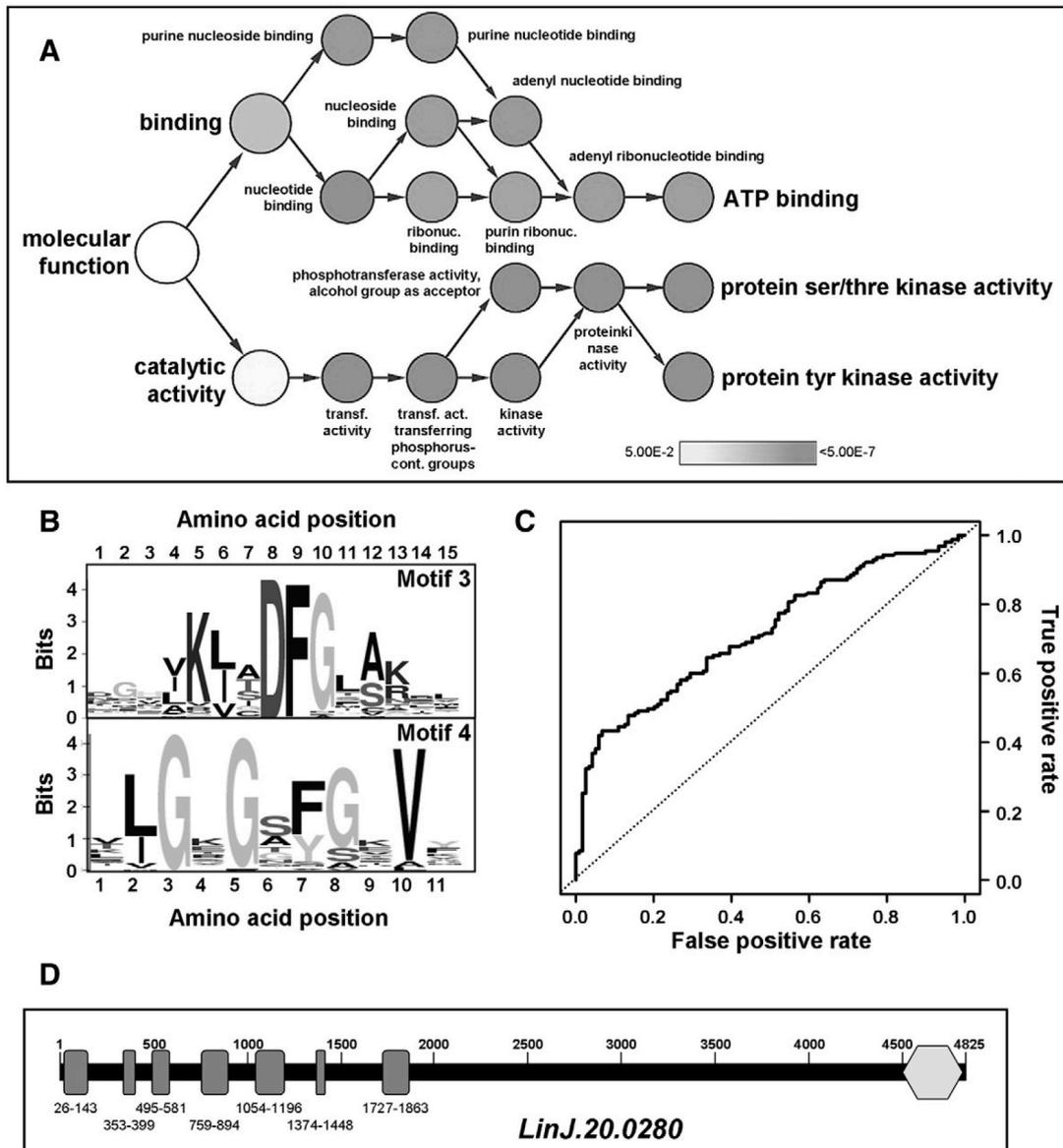


Fig. 2 – (A) Functional enrichment analysis. Overrepresented categories of GO molecular functions identified with the BiNGO plugin and visualized with Cytoscape software are shown. Gray levels indicate type I error level (hypergeometric test p-value) after false discovery rate correction. Branches of the network selected for statistical significance are represented (p-values < $5e-02$). The node area is proportional to the number of genes that correspond to a given GO category. (B) The sequence logos of the staurosporine-binding motifs 3 and 4, extracted from a non-redundant list of staurosporine binding kinases. Both motifs show remarkable preferences for residues in several positions flanking the already known patterns DFG and GxGxxG that contribute to the staurosporine-binding specificity. (C) ROC curve for the classification of staurosporine binding kinases obtained with a combination of motifs 3 and 4. The discriminative power of these motifs for the classification of staurosporine binding kinases was assessed on a human dataset (see Text). The ROC curve was generated using the residual activities of the kinases after staurosporine inhibition [23]. The classification of these kinases as staurosporine-binding or not was based on the presence in their sequence of both motifs 3 and 4 with an e-value $\leq 1e-07$. The AUC is 0.72. (D) Schematic representation of the hypothetical protein LinJ.20.0280. Gray boxes, ATP-binding sites; hexagon, von Willebrand factor type A (vWA) domain.

sequence with an e-value $< 1e-07$, otherwise the kinases were classified as non-binders. In order to assess the classification performance, for each motif combination we generated a receiver operating characteristic (ROC) curve using the

activity data on staurosporine treated human kinases [23]. This allowed us to identify the motif combinations that best distinguished between the binders and non-binders based on the highest significant Area Under Curve (AUC > 0.5). Our

analysis identified the combination of motifs 3 and 4 (Fig. 2B and Table S1) as most significant with an AUC value of 0.72 (Fig. 2C). Motif 3 mapped to a 15-residue long region containing the regulatory DFG sequence element, and motif 4 is located in an 11-residue long peptide comprising the GxGxxG pattern, which is known to be involved in ATP binding. Scanning the *L. infantum* genome database for these motifs revealed a total of 59 putative staurosporine-binding protein kinases, representing 29% of the annotated parasite kinome). The protein kinases identified by our assay showed a significant enrichment in these motifs with respect to the proteome and kinome (p -values $\leq 1.7 \times 10^{-11}$). Based on these results, the identification of 22 protein kinases with the CC indicates a putative enrichment efficiency of 40% of staurosporine-binding kinases present in the *Leishmania* kinome.

Finally, applying domain searches (Smart, PFAM, PROSITE, data not shown), and primary (BLAST) and secondary structure analyses (see Supplementary material) to reveal cryptic domains implicated in ATP-binding in the set of hypothetical proteins was largely unsuccessful, with the exception of the two hypothetical proteins LinJ.20.0280, a homolog of the nuclear chaperone midasin [24] containing multiple ATP-binding sites (Fig. 2D), and LinJ.09.1630 that contains a conserved SMC (structural maintenance of chromosomes) domain (E-value of 3.17×10^{-10}) involved in ATP-dependent organization and segregation of chromosomes [25]. The specific enrichment of the remaining hypothetical proteins by the CC either reflects co-purification of interaction partners of staurosporine-binding proteins, or alternatively may reveal the presence of *L. donovani* proteins that interact with this ATP-competitive inhibitor in a highly parasite-specific way in the absence of conserved functional domains. Future analysis of these hypothetical gene products for their capacity to directly bind and hydrolyze ATP by alternative biochemical and genetic approaches will be of important relevance for the functional annotation of the *Leishmania* genome and the discovery of novel, kinase-like drug targets with powerful druggability properties.

3. Conclusion

CCMS [18] is an innovative technology to reduce the complexity of biological samples through selective isolation of targeted protein or enzyme families, which allows the gel-free LC-MS/MS-based analysis of small molecule/protein interactions. By utilizing a staurosporine CC, we gained important insight into the cellular targets of this generic protein kinase inhibitor. These data are relevant to a recent study investigating the effects of staurosporine on *L. donovani* in culture, which caused defects in parasite motility and proliferation, and induced various apoptotic markers in the absence of cell death [26]. Based on this phenotype, staurosporine was proposed to target flagellar, cell cycle-dependent and pro-apoptotic protein kinases. Our data confirm this hypothesis as the staurosporine CC allowed for enrichment of protein kinases implicated in these processes, including the mitogen activated protein kinase MPK9 relevant for flagellar biogenesis (LinJ.19.0170, [27]), a CDK-like protein kinase implicated in growth control (LinJ.27.2570), and various pro-apoptotic protein kinases, including the PKA catalytic subunit LinJ.18.1090, and the AGC/NDR-like kinase LinJ.06.1220 [28–30]. Our data demonstrate the power of the CCMS technology for

compound-based target screens, an application that is of particular interest to anti-leishmanial drug screening campaigns that rely on phenotypic read outs [31]. Targets for these potential new inhibitors may be identified using customized CC in drug target deconvolution studies, which will be a prerequisite for structure-informed drug design through iterations of inhibitor/target co-crystallization, medicinal chemistry, and structure/activity relationship (SAR) analyses.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2013.05.002>.

Acknowledgments

We thank Sophie Veillault for the editorial help. This work was supported by the 7th Framework Programme of the European Commission through a grant to the LEISHDRUG (223414) consortium, by the Agence Nationale de Recherche through a grant to the ANR-11-RPIB-0016 TRANSLEISH consortium, and the French Government's Investissements d'Avenir program: Laboratoire d'Excellence 'Integrative Biology of Emerging Infectious Diseases' (grant no. ANR-10-LABX-62-IBEID).

REFERENCES

- [1] Reiland S, Salekdeh GH, Krijgsveld J. Defining pluripotent stem cells through quantitative proteomic analysis. *Expert Rev Proteomics* 2011;8:29–42.
- [2] Mullen E, Ohlendieck K. Proteomic profiling of non-obese type 2 diabetic skeletal muscle. *Int J Mol Med* 2010;25:445–58.
- [3] Ohlendieck K. Proteomics of skeletal muscle differentiation, neuromuscular disorders and fiber aging. *Expert Rev Proteomics* 2010;7:283–96.
- [4] Prokesch A, Hackl H, Hakim-Weber R, Bornstein SR, Trajanoski Z. Novel insights into adipogenesis from omics data. *Curr Med Chem* 2009;16:2952–64.
- [5] Kuramitsu Y, Nakamura K. Proteomic analysis of cancer tissues: shedding light on carcinogenesis and possible biomarkers. *Proteomics* 2006;6:5650–61.
- [6] Zhao H, Adler KB, Bai C, Tang F, Wang X. Epithelial proteomics in multiple organs and tissues: similarities and variations between cells, organs, and diseases. *J Proteome Res* 2006;5:743–55.
- [7] Spasovski G, Ortiz A, Vanholder R, El Nahas M. Proteomics in chronic kidney disease: The issues clinical nephrologists need an answer for. *Proteomics Clin Appl* 2011;5:233–40.
- [8] Van Eyk JE. Overview: the maturing of proteomics in cardiovascular research. *Circ Res* 2011;108:490–8.
- [9] Ekegren T, Hanrieder J, Bergquist J. Clinical perspectives of high-resolution mass spectrometry-based proteomics in neuroscience: exemplified in amyotrophic lateral sclerosis biomarker discovery research. *J Mass Spectrom* 2008;43:559–71.
- [10] Hem S, Gherardini PF, Osorio y Fortea J, Hourdel V, Morales MA, Watanabe R, et al. Identification of *Leishmania*-specific protein phosphorylation sites by LC-ESI-MS/MS and comparative genomics analyses. *Proteomics* 2010;10:3868–83.
- [11] Morales MA, Watanabe R, Dacher M, Chafey P, Osorio y Fortea J, Scott DA, et al. Phosphoproteome dynamics reveal heat-shock protein complexes specific to the *Leishmania donovani* infectious stage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:8381–6.
- [12] Morales MA, Watanabe R, Laurent C, Lenormand P, Rousselle JC, Namane A, et al. Phosphoproteomic analysis of *Leishmania donovani* pro- and amastigote stages. *Proteomics* 2008;8:350–63.

- [13] Rosenzweig D, Smith D, Opperdoes F, Stern S, Olafson RW, Zilberstein D. Retooling *Leishmania* metabolism: from sand fly gut to human macrophage. *FASEB J* 2008;22:590–602.
- [14] Saxena A, Lahav T, Holland N, Aggarwal G, Anupama A, Huang Y, et al. Analysis of the *Leishmania donovani* transcriptome reveals an ordered progression of transient and permanent changes in gene expression during differentiation. *Mol Biochem Parasitol* 2007;152:53–65 [Epub 2006 Dec 12].
- [15] Bente M, Harder S, Wiesgigl M, Heukeshoven J, Gelhaus C, Krause E, et al. Developmentally induced changes of the proteome in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Proteomics* 2003;3:1811–29.
- [16] Leifso K, Cohen-Freue G, Dogra N, Murray A, McMaster WR. Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: the *Leishmania* genome is constitutively expressed. *Mol Biochem Parasitol* 2007;152:35–46.
- [17] Schmidt-Arras D, Leclercq O, Gherardini PF, Helmer-Citterich M, Faigle W, Loew D, et al. Adaptation of a 2D in-gel kinase assay to trace phosphotransferase activities in the human pathogen *Leishmania donovani*. *J Proteomics* 2011;74:1644–51.
- [18] Koster H, Little DP, Luan P, Muller R, Siddiqi SM, Marappan S, et al. Capture Compound Mass Spectrometry: a technology for the investigation of small molecule protein interactions. *Assay Drug Dev Technol* 2007;5:381–90.
- [19] Maere S, Heymans K, Kuiper M. BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. *Bioinformatics* 2005;21:3448–9.
- [20] Cline MS, Smoot M, Cerami E, Kuchinsky A, Landys N, Workman C, et al. Integration of biological networks and gene expression data using Cytoscape. *Nat Protoc* 2007;2:2366–82.
- [21] Bailey TL, Williams N, Misleh C, Li WW. MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs. *Nucleic Acids Res* 2006;34:W369–73.
- [22] Notredame C, Higgins DG, Heringa J. T-coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol* 2000;302:205–17.
- [23] Anastassiadis T, Deacon SW, Devarajan K, Ma H, Peterson JR. Comprehensive assay of kinase catalytic activity reveals features of kinase inhibitor selectivity. *Nat Biotechnol* 2011;29:1039–45.
- [24] Garbarino JE, Gibbons IR. Expression and genomic analysis of midasin, a novel and highly conserved AAA protein distantly related to dynein. *BMC Genomics* 2002;3:18.
- [25] Hirano T. At the heart of the chromosome: SMC proteins in action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:311–22.
- [26] Foucher AL, Rachidi N, Gharbi S, Blisnick T, Bastin P, Pemberton IK, et al. Apoptotic marker expression in the absence of cell death in staurosporine-treated *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:1252–61.
- [27] Bengs F, Scholz A, Kuhn D, Wiese M. LmxMPK9, a mitogen-activated protein kinase homologue affects flagellar length in *Leishmania mexicana*. *Mol Microbiol* 2005;55:1606–15.
- [28] Insel PA, Zhang L, Murray F, Yokouchi H, Zambon AC. Cyclic AMP is both a pro-apoptotic and anti-apoptotic second messenger. *Acta Physiol (Oxf)* 2012;204:277–87.
- [29] Franklin RA, McCubrey JA. Kinases: positive and negative regulators of apoptosis. *Leukemia* 2000;14:2019–34.
- [30] Hergovich A, Stegert MR, Schmitz D, Hemmings BA. NDR kinases regulate essential cell processes from yeast to humans. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:253–64.
- [31] Aulner N, Danckaert A, Rouault-Hardoin E, Desrivot J, Helynck O, Commere PH, et al. High content analysis of primary macrophages hosting proliferating *Leishmania* amastigotes: application to anti-leishmanial drug discovery. *PLoS Negl Trop Dis* 2013;7(3):1252–61.

Bibliographie

Bibliographie

- Allocco, J.J., Donald, R., Zhong, T., Lee, A., Tang, Y.S., Hendrickson, R.C., Liberator, P., and Nare, B. (2006). Inhibitors of casein kinase 1 block the growth of *Leishmania major* promastigotes in vitro. *Int J Parasitol* 36, 1249-1259.
- Alvar, J., Velez, I.D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., and den Boer, M. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 7, e35671.
- Antoine, J.C., Prina, E., Lang, T., and Courret, N. (1998). The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. *Trends Microbiol* 6, 392-401.
- Aulner, N., Danckaert, A., Rouault-Hardoin, E., Desrivot, J., Helynck, O., Commere, P.-H., Munier-Lehmann, H., Späth, G.F., Shorte, S.L., Milon, G., *et al.* (2013). High Content Analysis of Primary Macrophages Hosting Proliferating *Leishmania* Amastigotes: Application to Anti-leishmanial Drug Discovery. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7, e2154.
- Bantscheff, M., Eberhard, D., Abraham, Y., Bastuck, S., Boesche, M., Hobson, S., Mathieson, T., Perrin, J., Raida, M., Rau, C., *et al.* (2007a). Quantitative chemical proteomics reveals mechanisms of action of clinical ABL kinase inhibitors. *Nat Biotechnol* 25, 1035-1044.
- Bantscheff, M., Hopf, C., Kruse, U., and Drewes, G. (2007b). Proteomics-based strategies in kinase drug discovery. *Ernst Schering Found Symp Proc*, 1-28.
- Barak, E., Amin-Spector, S., Gerliak, E., Goyard, S., Holland, N., and Zilberstein, D. (2005). Differentiation of *Leishmania donovani* in host-free system: analysis of signal perception and response. *Molecular and Biochemical Parasitology* 141, 99-108.
- Besteiro, S., Williams, R.A.M., Coombs, G.H., and Mottram, J.C. (2007). Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *International Journal for Parasitology* 37, 1063-1075.
- Britto, C., Ravel, C., Bastien, P., Blaineau, C., Pages, M., Dedet, J.P., and Wincker, P. (1998). Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World *Leishmania* genomes. *Gene* 222, 107-117.
- Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R.W., Alvar, J., and Boelaert, M. (2007). Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews Microbiology* 5, S7-S16.
- Clayton, C.E. (2002). Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *EMBO J* 21, 1881-1888.
- Croft, S.L., and Coombs, G.H. (2003). Leishmaniasis— current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends in Parasitology* 19, 502-508.
- Docampo, R., de Souza, W., Miranda, K., Rohloff, P., and Moreno, S.N.J. (2005). Acidocalcisomes ? conserved from bacteria to man. *Nature Reviews Microbiology* 3, 251-261.
- Drini, S., Criscuolo, A., Lechat, P., Imamura, H., Skalicky, T., Rachidi, N., Lukes, J., Dujardin, J.C., and Spath, G.F. (2016). Species- and Strain-Specific Adaptation of the HSP70 Super Family in Pathogenic Trypanosomatids. *Genome Biol Evol* 8, 1980-1995.
- Drummelsmith, J., Brochu, V., Girard, I., Messier, N., and Ouellette, M. (2003). Proteome mapping of the protozoan parasite *Leishmania* and application to the study of drug targets and resistance mechanisms. *Mol Cell Proteomics* 2, 146-155.
- Dülsner, E., Fischer, J.J., Jurinke, C., and Köster, H. (2009). Functional isolation of staurosporine binding protein kinases using CCMS technology. *nature methods*.
- Durieu, E., Prina, E., Leclercq, O., Oumata, N., Gaboriaud-Kolar, N., Vougiannopoulou, K., Aulner, N., Defontaine, A., No, J.H., Ruchaud, S., *et al.* (2016). From Drug Screening to Target Deconvolution: a Target-Based Drug Discovery Pipeline Using *Leishmania* Casein Kinase 1 Isoform 2 To Identify Compounds with Antileishmanial Activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 60, 2822-2833.
- Eglen, R., and Reisine, T. (2011). Drug discovery and the human kinome: Recent trends. *Pharmacology & Therapeutics* 130, 144-156.

Bibliographie

- El Fakhry, Y., Ouellette, M., and Papadopoulou, B. (2002). A proteomic approach to identify developmentally regulated proteins in *Leishmania infantum*. *Proteomics* 2, 1007-1017.
- Fiebig, M., Kelly, S., and Gluenz, E. (2015). Comparative Life Cycle Transcriptomics Revises *Leishmania mexicana* Genome Annotation and Links a Chromosome Duplication with Parasitism of Vertebrates. *PLoS Pathog* 11, e1005186.
- Fischer, J.J., Dalhoff, C., Schrey, A.K., Graebner neé Baessler, O.Y., Michaelis, S., Andrich, K., Glinski, M., Kroll, F., Sefkow, M., Dreger, M., *et al.* (2011). Dasatinib, imatinib and staurosporine capture compounds — Complementary tools for the profiling of kinases by Capture Compound Mass Spectrometry (CCMS). *Journal of Proteomics* 75, 160-168.
- Foucher, A.L., Rachidi, N., Gharbi, S., Blisnick, T., Bastin, P., Pemberton, I.K., and Spath, G.F. (2012). Apoptotic Marker Expression in the Absence of Cell Death in Staurosporine-Treated *Leishmania donovani*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57, 1252-1261.
- Gazanion, E., Fernandez-Prada, C., Papadopoulou, B., Leprohon, P., and Ouellette, M. (2016). Cos-Seq for high-throughput identification of drug target and resistance mechanisms in the protozoan parasite *Leishmania*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, E3012-3021.
- Goyard, S., Segawa, H., Gordon, J., Showalter, M., Duncan, R., Turco, S.J., and Beverley, S.M. (2003). An in vitro system for developmental and genetic studies of *Leishmania donovani* phosphoglycans. *Molecular and Biochemical Parasitology* 130, 31-42.
- Guerin, P.J., Olliaro, P., Sundar, S., Boelaert, M., Croft, S.L., Desjeux, P., Wasunna, M.K., and Bryceson, A.D.M. (2002). Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *The Lancet Infectious Diseases* 2, 494-501.
- Haystead, T.A. (2006). The purinome, a complex mix of drug and toxicity targets. *Curr Top Med Chem* 6, 1117-1127.
- Ito, J., Heazlewood, J.L., and Millar, A.H. (2006). Analysis of the soluble ATP-binding proteome of plant mitochondria identifies new proteins and nucleotide triphosphate interactions within the matrix. *J Proteome Res* 5, 3459-3469.
- Ivens, A.C., Peacock, C.S., Worthey, E.A., Murphy, L., Aggarwal, G., Berriman, M., Sisk, E., Rajandream, M.A., Adlem, E., Aert, R., *et al.* (2005). The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* 309, 436-442.
- Kamhawi, S. (2000). The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. *Microbes Infect* 2, 1765-1773.
- Karaman, M.W., Herrgard, S., Treiber, D.K., Gallant, P., Atteridge, C.E., Campbell, B.T., Chan, K.W., Ciceri, P., Davis, M.I., Edeen, P.T., *et al.* (2008). A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nature Biotechnology* 26, 127-132.
- Kaye, P., and Scott, P. (2011). Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. *Nature Reviews Microbiology* 9, 604-615.
- Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N., and Sternberg, M.J. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc* 10, 845-858.
- Killick-Kendrick, R. (1999). The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin Dermatol* 17, 279-289.
- Kruger, T., and Engstler, M. (2015). Flagellar motility in eukaryotic human parasites. *Semin Cell Dev Biol* 46, 113-127.
- Laffitte, M.C., Leprohon, P., Legare, D., and Ouellette, M. (2016). Deep-sequencing revealing mutation dynamics in the miltefosine transporter gene in *Leishmania infantum* selected for miltefosine resistance. *Parasitol Res* 115, 3699-3703.
- Leclercq, O., Bartho, K., Duelsner, E., von Kleist, L., Gherardini, P.F., Palmeri, A., Helmer-Citterich, M., Baumgart, S., and Späth, G.F. (2013). Enrichment of *Leishmania donovani* ATP-binding proteins using a staurosporine capture compound. *Journal of Proteomics* 86, 97-104.

Bibliographie

- Leclercq, O., Schmidt-Arras, D., Gherardini, P.F., Helmer-Citterich, M., Faigle, W., Loew, D., and Späth, G.F. (2011). Adaptation of a 2D in-gel kinase assay to trace phosphotransferase activities in the human pathogen *Leishmania donovani*. *Journal of Proteomics* **74**, 1644-1651.
- Lee, J., and Bogoy, M. (2013). Target deconvolution techniques in modern phenotypic profiling. *Current Opinion in Chemical Biology* **17**, 118-126.
- Lindgren, E., Andersson, Y., Suk, J.E., Sudre, B., and Semenza, J.C. (2012). Monitoring EU Emerging Infectious Disease Risk Due to Climate Change. *Science* **336**.
- Longshaw, V.M., Chapple, J.P., Balda, M.S., Cheetham, M.E., and Blatch, G.L. (2004). Nuclear translocation of the Hsp70/Hsp90 organizing protein mST11 is regulated by cell cycle kinases. *J Cell Sci* **117**, 701-710.
- Maroli, M., Feliciangeli, M.D., Bichaud, L., Charrel, R.N., and Gradoni, L. (2013). Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and Veterinary Entomology* **27**, 123-147.
- Matte, A., and Delbaere, L.T.J. (2010). ATP-binding Motifs. *Encyclopedia of Life Sciences*.
- Meijer, L., Skaltsounis, A.-L., Magiatis, P., Polychronopoulos, P., Knockaert, M., Leost, M., Ryan, X.P., Vonica, C.A., Brivanlou, A., Dajani, R., *et al.* (2003). GSK-3-Selective Inhibitors Derived from Tyrian Purple Indirubins. *Chemistry & Biology* **10**, 1255-1266.
- Morales, M.A., Renaud, O., Faigle, W., Shorte, S.L., and Späth, G.F. (2007). Over-expression of *Leishmania* major MAP kinases reveals stage-specific induction of phosphotransferase activity. *International Journal for Parasitology* **37**, 1187-1199.
- Morales, M.A., Watanabe, R., Dacher, M., Chafey, P., Osorio y Fortea, J., Scott, D.A., Beverley, S.M., Ommen, G., Clos, J., Hem, S., *et al.* (2010). Phosphoproteome dynamics reveal heat-shock protein complexes specific to the *Leishmania donovani* infectious stage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 8381-8386.
- Morales, M.A., Watanabe, R., Laurent, C., Lenormand, P., Rousselle, J.C., Namane, A., and Späth, G.F. (2008). Phosphoproteomic analysis of *Leishmania donovani* pro- and amastigote stages. *Proteomics* **8**, 350-363.
- Murray, H.W., Berman, J.D., Davies, C.R., and Saravia, N.G. (2005). Advances in leishmaniasis. *The Lancet* **366**, 1561-1577.
- Murray, J.M., and Bussiere, D.E. (2009). Targeting the Purinome. *Chemogenomics, Methods in Molecular Biology* **575**, 47 - 92.
- Naula, C., Parsons, M., and Mottram, J.C. (2005). Protein kinases as drug targets in trypanosomes and *Leishmania*. *Biochim Biophys Acta* **1754**, 151-159.
- No, J.H. (2016). Visceral leishmaniasis: Revisiting current treatments and approaches for future discoveries. *Acta Tropica* **155**, 113-123.
- Ouellette, M., Olivier, M., Sato, S., and Papadopoulou, B. (2003). [Studies on the parasite *Leishmania* in the post-genomic era]. *Med Sci (Paris)* **19**, 900-909.
- Parsons, M., Worthey, E.A., Ward, P.N., and Mottram, J.C. (2005). Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic trypanosomatids: *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics* **6**, 127.
- Patricelli, M.P., Szardenings, A.K., Liyanage, M., Nomanbhoy, T.K., Wu, M., Weissig, H., Aban, A., Chun, D., Tanner, S., and Kozarich, J.W. (2007). Functional interrogation of the kinome using nucleotide acyl phosphates. *Biochemistry* **46**, 350-358.
- Pescher, P., Blisnick, T., Bastin, P., and Späth, G.F. (2011). Quantitative proteome profiling informs on phenotypic traits that adapt *Leishmania donovani* for axenic and intracellular proliferation. *Cellular Microbiology* **13**, 978-991.
- Piersma, S.R., Warmoes, M.O., de Wit, M., de Reus, I., Knol, J.C., and Jimenez, C.R. (2013). Whole gel processing procedure for GeLC-MS/MS based proteomics. *Proteome Sci* **11**, 17.

Bibliographie

- Pouillet, P., Carpentier, S., and Barillot, E. (2007). myProMS, a web server for management and validation of mass spectrometry-based proteomic data. *Proteomics* 7, 2553-2556.
- Ptacek, J., Devgan, G., Michaud, G., Zhu, H., Zhu, X., Fasolo, J., Guo, H., Jona, G., Breitschütz, A., Sopko, R., *et al.* (2005). Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature* 438, 679-684.
- Rachidi, N., Taly, J.F., Durieu, E., Leclercq, O., Aulner, N., Prina, E., Pescher, P., Notredame, C., Meijer, L., and Spath, G.F. (2014). Pharmacological assessment defines *Leishmania donovani* casein kinase 1 as a drug target and reveals important functions in parasite viability and intracellular infection. *Antimicrob Agents Chemother* 58, 1501-1515.
- Rajasekaran, R., and Chen, Y.-P.P. (2015). Potential therapeutic targets and the role of technology in developing novel antileishmanial drugs. *Drug Discovery Today* 20, 958-968.
- Reguera, R.M., Calvo-Álvarez, E., Álvarez-Velilla, R., and Balaña-Fouce, R. (2014). Target-based vs. phenotypic screenings in *Leishmania* drug discovery: A marriage of convenience or a dialogue of the deaf? *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* 4, 355-357.
- Rogers, M.B., Hilley, J.D., Dickens, N.J., Wilkes, J., Bates, P.A., Depledge, D.P., Harris, D., Her, Y., Herzyk, P., Imamura, H., *et al.* (2011). Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. *Genome Res* 21, 2129-2142.
- Rogers, M.E., Ilg, T., Nikolaev, A.V., Ferguson, M.A., and Bates, P.A. (2004). Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature* 430, 463-467.
- Rosenzweig, D., Smith, D., Opperdoes, F., Stern, S., Olafson, R.W., and Zilberstein, D. (2007). Retooling *Leishmania* metabolism: from sand fly gut to human macrophage. *The FASEB Journal* 22, 590-602.
- Rosenzweig, D., Smith, D., Opperdoes, F., Stern, S., Olafson, R.W., and Zilberstein, D. (2008). Retooling *Leishmania* metabolism: from sand fly gut to human macrophage. *FASEB J* 22, 590-602.
- Sacks, D., and Kamhawi, S. (2001). Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol* 55, 453-483.
- Saxena, A., Lahav, T., Holland, N., Aggarwal, G., Anupama, A., Huang, Y., Volpin, H., Myler, P.J., and Zilberstein, D. (2007). Analysis of the *Leishmania donovani* transcriptome reveals an ordered progression of transient and permanent changes in gene expression during differentiation. *Mol Biochem Parasitol* 152, 53-65.
- Seaman, J., Mercer, A.J., and Sondorp, E. (1996). The epidemic of visceral leishmaniasis in western Upper Nile, southern Sudan: course and impact from 1984 to 1994. *Int J Epidemiol* 25, 862-871.
- Silverman, J.M., Chan, S.K., Robinson, D.P., Dwyer, D.M., Nandan, D., Foster, L.J., and Reiner, N.E. (2008). Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*. *Genome Biol* 9, R35.
- Swinney, D.C. (2013). Phenotypic vs. target-based drug discovery for first-in-class medicines. *Clin Pharmacol Ther* 93, 299-301.
- Terstappen, G.C., Schlüpen, C., Raggiaschi, R., and Gaviraghi, G. (2007). Target deconvolution strategies in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* 6, 891-903.
- Tsigankov, P., Gherardini, P.F., Helmer-Citterich, M., Spath, G.F., Myler, P.J., and Zilberstein, D. (2014). Regulation dynamics of *Leishmania* differentiation: deconvoluting signals and identifying phosphorylation trends. *Mol Cell Proteomics* 13, 1787-1799.
- Tsigankov, P., Gherardini, P.F., Helmer-Citterich, M., and Zilberstein, D. (2012). What has proteomics taught us about *Leishmania* development? *Parasitology* 139, 1146-1157.
- Urbaniak, M.D., Mathieson, T., Bantscheff, M., Eberhard, D., Grimaldi, R., Miranda-Saavedra, D., Wyatt, P., Ferguson, M.A.J., Frearson, J., and Drewes, G. (2012). Chemical Proteomic Analysis Reveals the Drugability of the Kinome of *Trypanosoma brucei*. *ACS Chemical Biology* 7, 1858-1865.

Bibliographie

- Villamor, J.G., Kaschani, F., Colby, T., Oeljeklaus, J., Zhao, D., Kaiser, M., Patricelli, M.P., and van der Hoorn, R.A. (2013). Profiling protein kinases and other ATP binding proteins in Arabidopsis using Acyl-ATP probes. *Mol Cell Proteomics* 12, 2481-2496.
- Wheeler, R.J., Gluenz, E., and Gull, K. (2013). The limits on trypanosomatid morphological diversity. *PLoS One* 8, e79581.
- WHO (2010). Control of the leishmaniasis. WHO Technical Report Series.
- Wolfe, L.M., Veeraraghavan, U., Idicula-Thomas, S., Schurer, S., Wennerberg, K., Reynolds, R., Besra, G.S., and Dobos, K.M. (2013). A chemical proteomics approach to profiling the ATP-binding proteome of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Cell Proteomics* 12, 1644-1660.
- Wooten, M.W. (2002). In-Gel Kinase Assay as a Method to Identify Kinase Substrates. *Science Signaling* 2002, pl15-pl15.
- Yau, W.L., Blisnick, T., Taly, J.F., Helmer-Citterich, M., Schiene-Fischer, C., Leclercq, O., Li, J., Schmidt-Arras, D., Morales, M.A., Notredame, C., *et al.* (2010). Cyclosporin A treatment of *Leishmania donovani* reveals stage-specific functions of cyclophilins in parasite proliferation and viability. *PLoS Negl Trop Dis* 4, e729.
- Zhang, J., Yang, P.L., and Gray, N.S. (2009). Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Cancer* 9, 28-39.
- Zijlstra, E.E., Musa, A.M., Khalil, E.A.G., El Hassan, I.M., and El-Hassan, A.M. (2003). Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases* 3, 87-98.

Etablissement d'une approche de déconvolution de cibles pour des composés leishmanicides

Olivier Leclercq

8 décembre 2016

Aujourd'hui, les médicaments utilisés pour traiter la leishmaniose ont de nombreux effets secondaires graves et leur utilisation est fortement compromise par l'apparition de parasites résistants. Il devient donc urgent et indispensable d'obtenir de nouveaux médicaments pour combattre efficacement la maladie. Ces dernières années, les compagnies pharmaceutiques ont réalisés des campagnes de criblages qui ont permis d'identifier des milliers de composés présentant un effet leishmanicide. Toutefois, comme leurs cibles sont inconnues, ces composés sont difficiles à optimiser, ce qui à terme pourrait entraîner des effets secondaires pour les médicaments dérivés de ces composés. Ainsi, la déconvolution de cibles, est devenue un enjeu majeur, puisqu'elle permet l'identification des cibles primaires et/ou secondaires des composés afin de comprendre leur mécanisme d'action et de favoriser leur optimisation. Nous avons réalisés une campagne de criblage qui nous a permis d'identifier une dizaine d'inhibiteurs potentiels de kinases efficaces contre le parasite. Afin de déterminer leurs cibles, j'ai développé une stratégie de déconvolution adaptée à ces inhibiteurs qui consiste dans un premier temps en un enrichissement sélectif des protéines de liaison à l'ATP de *Leishmania* (ATPome) par chromatographie d'affinité à l'ATP, puis dans un deuxième temps en une compétition par le composé d'intérêt. La méthode d'enrichissement a été très efficace puisqu'elle a permis d'obtenir le premier ATPome jamais réalisé chez les trypanosomatidés avec l'identification de 1177 protéines de liaisons à l'ATP potentielles, comprenant 205 protéines annotées pour la fonction de liaison à l'ATP (Gene Ontology : 0005524), dont 80 kinases et environ 80 protéines hypothétiques avec un domaine de liaison à l'ATP ou une fonction ATPase connue, mais non annotés. J'ai ensuite optimisé l'étape de compétition et établi la preuve de concept en utilisant un couple inhibiteur-kinase connu. Finalement, en combinant cette méthode avec la 2D-DiGE, j'ai établi une méthode rapide, visuelle et semi-quantitative qui me permet de déterminer si les inhibiteurs sont à large spectre ou spécifiques ; seuls ces derniers seront optimisés. Cette méthode permet donc de déterminer visuellement l'efficacité et la spécificité des composés compétitifs de l'ATP. En utilisant cette approche, sur les dix composés initialement obtenus par criblage, j'ai pu en sélectionner deux qui soient spécifiques. Pour ces deux composés, les cibles seront identifiées par spectrométrie de masse.

Mots-clés

Leishmania, ATPome, kinases, médicaments, chromatographie, protéomique, déconvolution de cibles