



Les enzymes lipolytiques de *Mycobacterium tuberculosis* : du moléculaire au thérapeutique

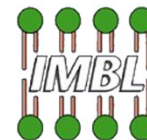
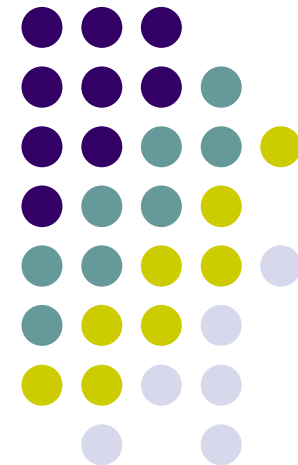


Jean-François Cavalier

Equipe « *Lipolyse & Pathogénie Bactérienne* »

Dr. Stéphane Canaan

EIPL UMR7282 CNRS - Marseille



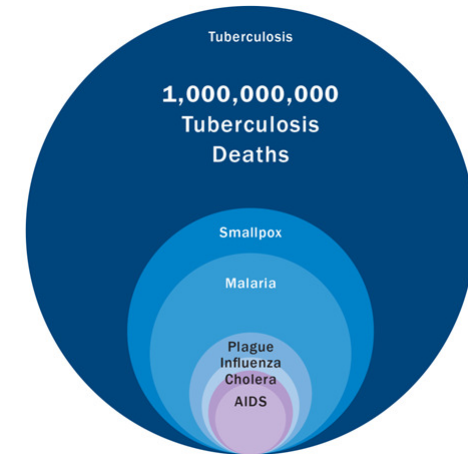
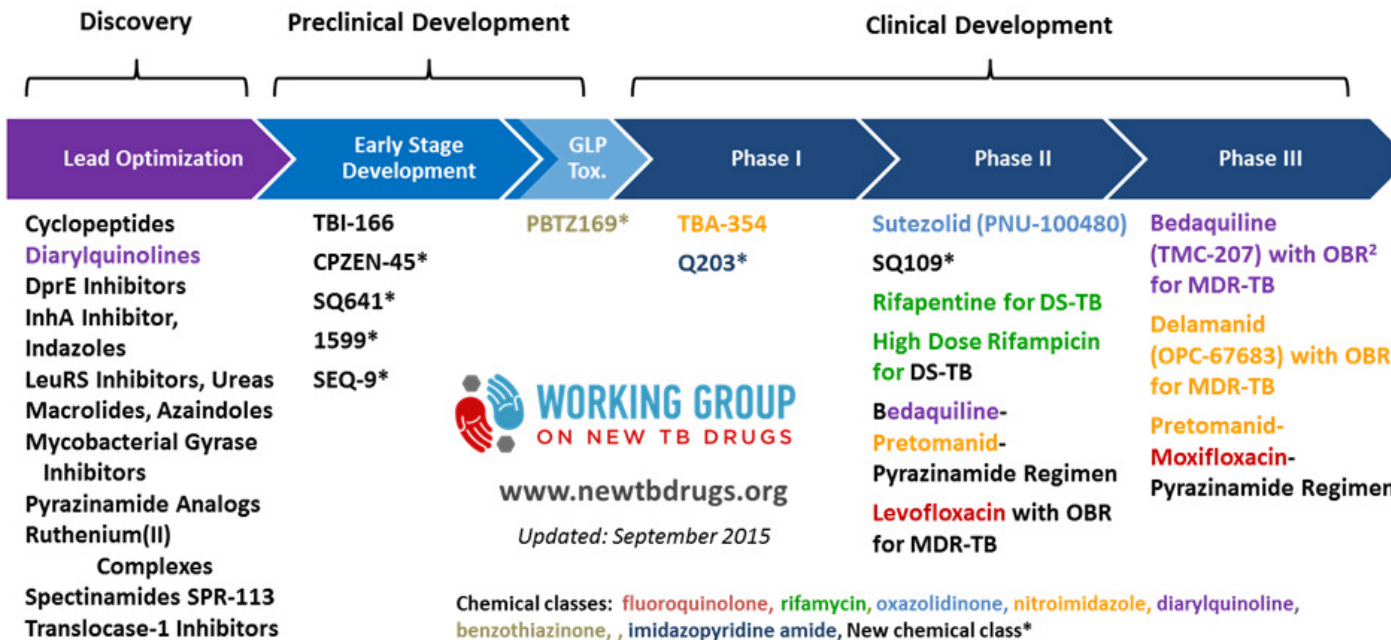
La Tuberculose (TB)

2,5 milliards de personne contaminées
 1,5 millions de morts en 2013, 9 millions de nouveau cas
 Apparition de souches résistantes (MDR et XDR)

► Chimiothérapie existante

- ↳ 4 mois : Isoniazide (1952), Rifampicine (1966), Pyrazinamide (1952), Ethambutol (1961)
- ↳ 5 mois : Isoniazide (1952), Rifampicine (1966)

► Nouveaux antituberculeux

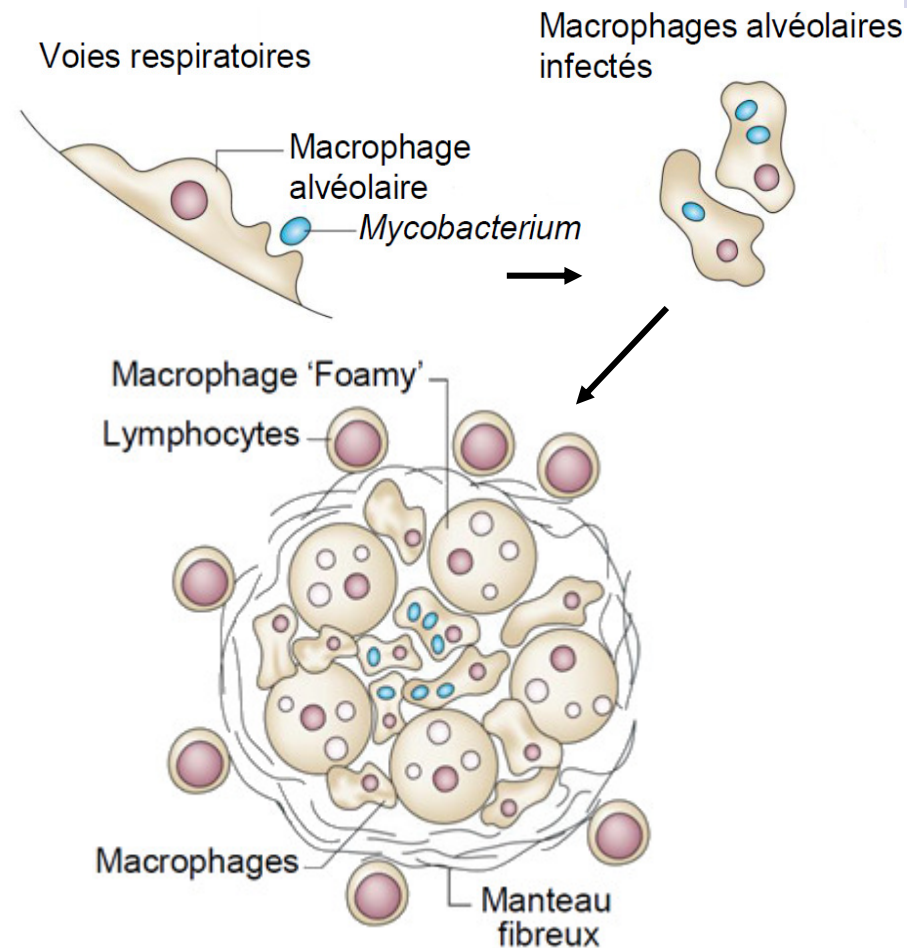


Mycobacterium tuberculosis (*M. tb.*)

Colorized scanning electron micrograph of *M. tb.*
Source: Clifton E. Barry III, Ph.D., NIAID, NIH



- ▶ La transmission de *M. tb.* se fait par l'intermédiaire d'aérosols contaminés
- ▶ Au contact du tissu pulmonaire les bacilles vont interagir avec les cellules de l'immunité innée



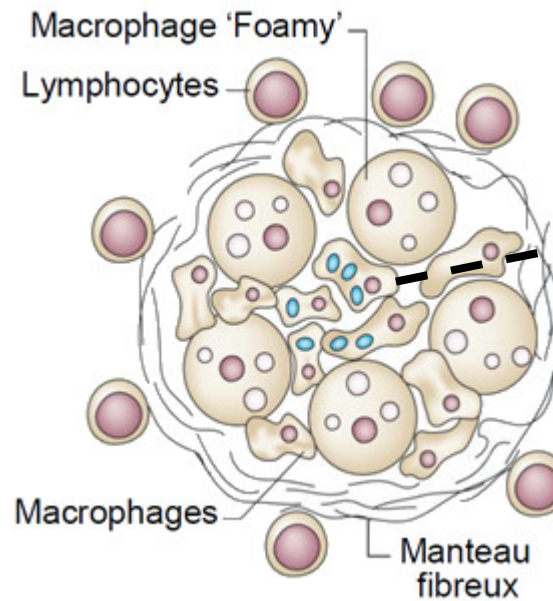
Formation d'un granulome
(recrutement de cellules
dendritiques, lymphocytes,
macrophages)

Mycobacterium tuberculosis (*M. tb.*)

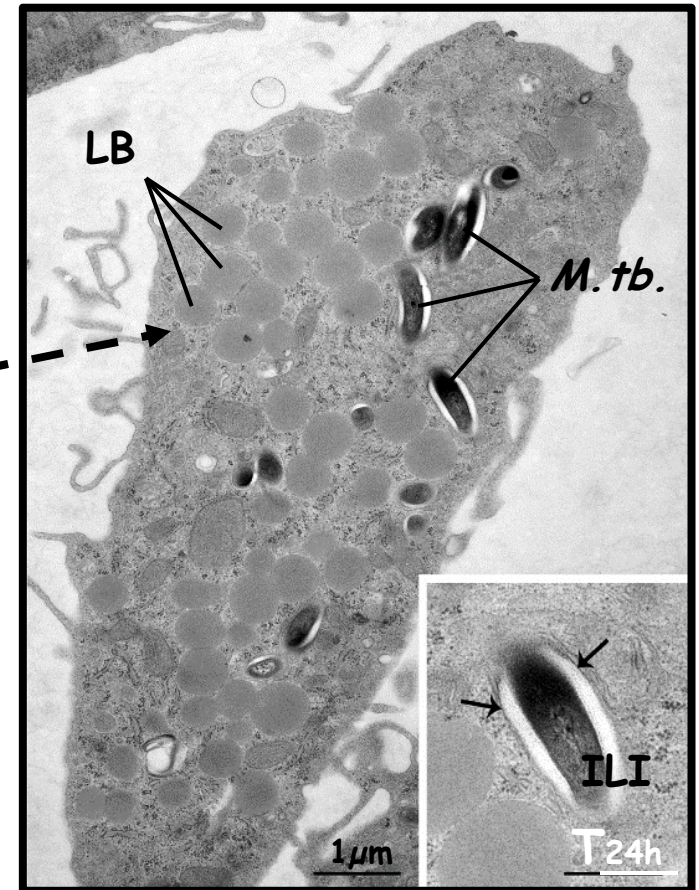
Colorized scanning electron micrograph of *M. tb.*
Source: Clifton E. Barry III, Ph.D., NIAID, NIH



- ▶ La transmission de *M. tb.* se fait par l'intermédiaire d'aérosols contaminés
- ▶ Au contact du tissu pulmonaire les bacilles vont interagir avec les cellules de l'immunité innée

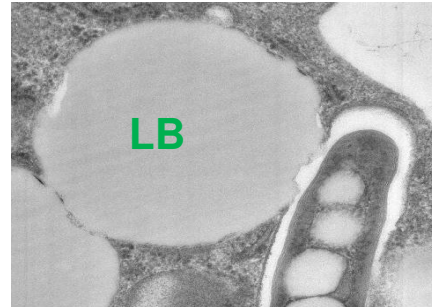


Formation d'un granulome
(recrutement de cellules dendritiques, lymphocytes, macrophages)



Stockage des lipides par *M. tb.*

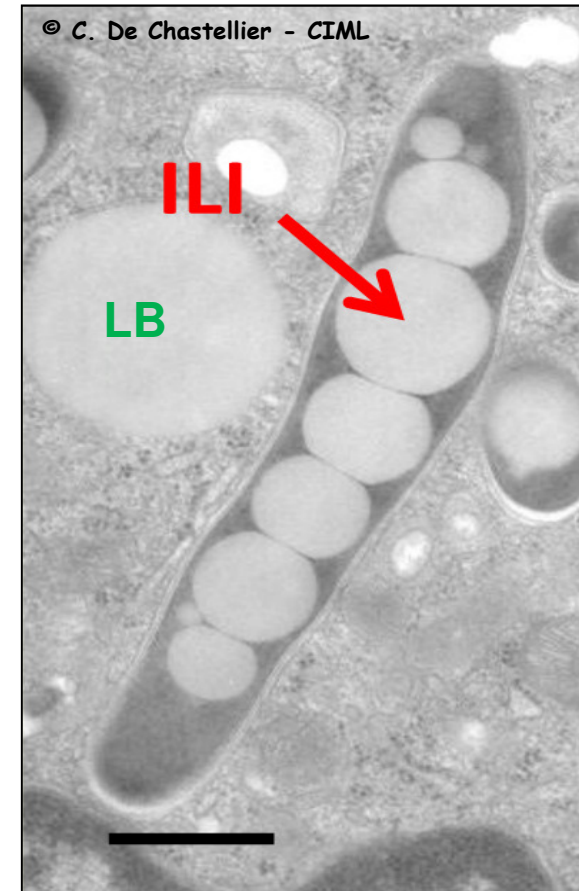
▶ Hydrolyse des lipides de l'hôte (LB)



▶ Accumule les lipides dans des corps d'Inclusion Lipidiques Intracytoplasmiques (ILI)

- ↳ Entrée dans un stade non-réplicatif : dormance,
- ↳ Résistante aux antibiotiques

→ Les lipides des ILIs sont utilisés comme source de carbone par la bactérie au moment de la réactivation



Caire-Brändli et al., *Infect. Immun.* 2014

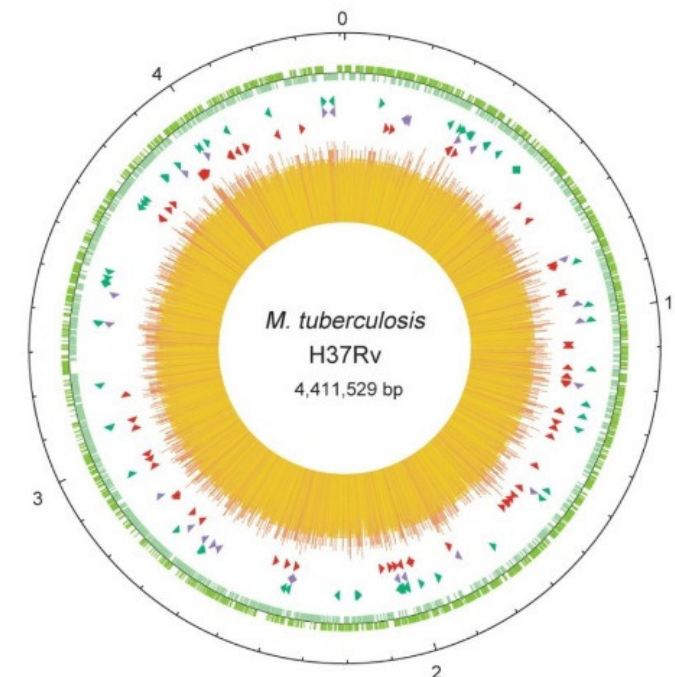
*Implication d'enzymes
lipolytiques mycobactériennes*

Mycobacterium tuberculosis (*M. tb.*)

28 gènes codant pour des enzymes lipolytiques putatives

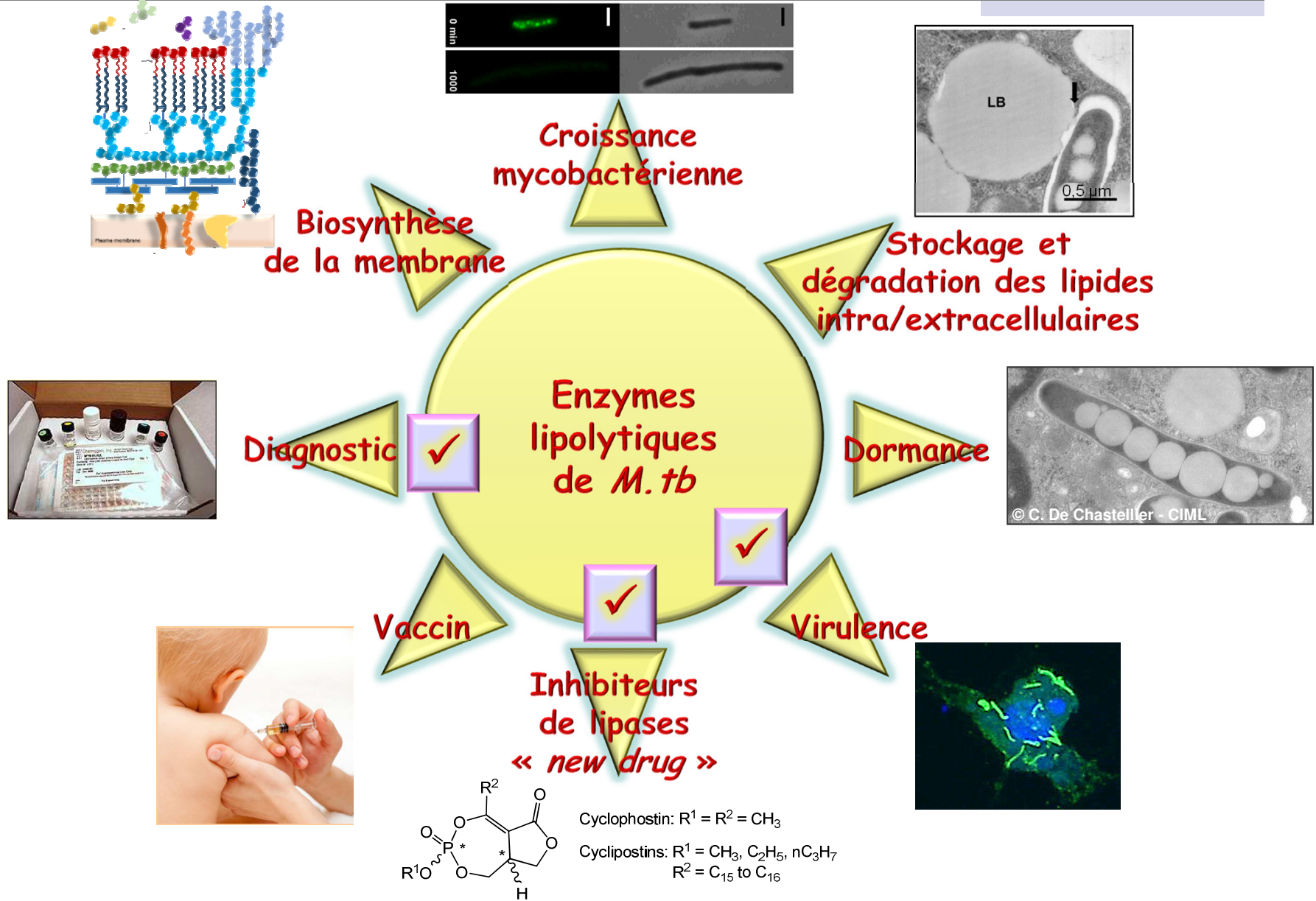
Famille	Nombre de gènes
HSL-like (lipase hormono-sensible humaine)	12
Cutinase-like (cutinase de <i>Fusarium solani</i>)	7
<i>hMGL</i> -like (monoglyceride lipase humaine)	3
<i>hCEH</i> -like (carboxylester hydrolase humaine)	1
<i>Candida parapsilosis</i> Lip1 lipase	1
Phospholipases C	4

Dedieu et al., *Biochimie* 2013.
Delorme et al., *PLoS One* 2012.



Cole et al., *Nature* 1998

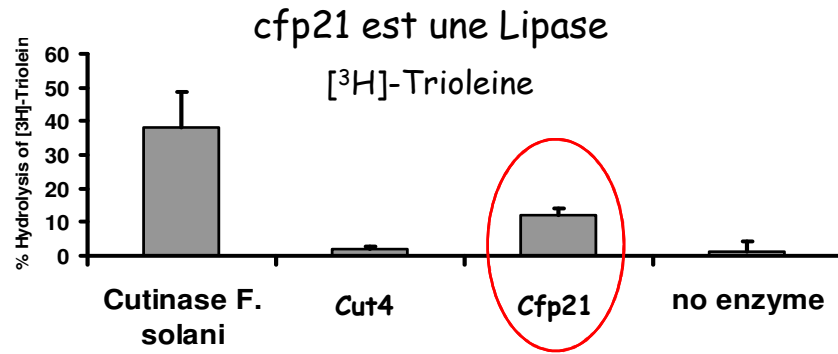
Rôle clé des enzymes lipolytiques



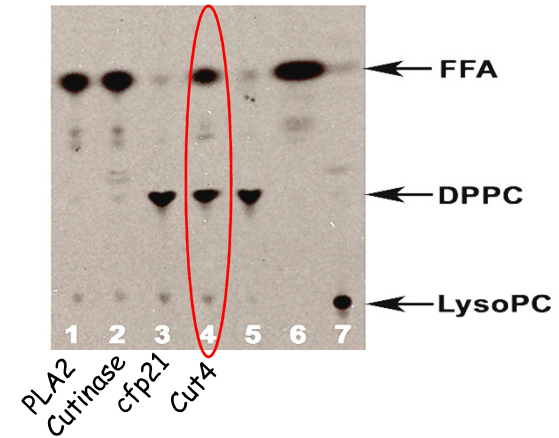
Les Cutinases : des enzymes lipolytiques cytotoxiques

Cfp21 (Rv1984c) et Cut4 (Rv3452)

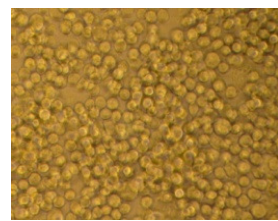
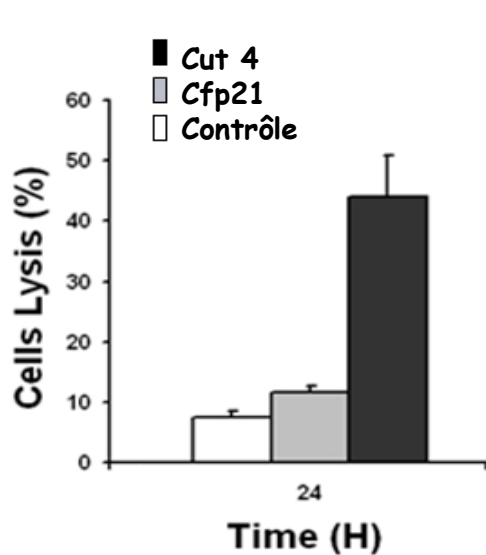
→ Enzymes secrétées, 50% d'identité, sérine hydrolase



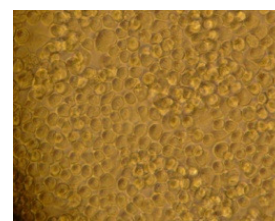
Cut4 est une Phospholipase



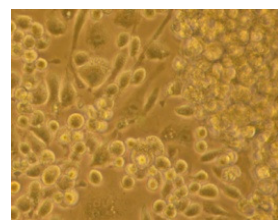
Cytotoxicité sur des macrophages



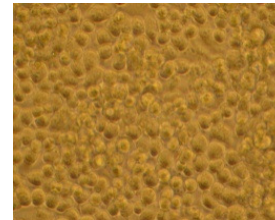
Contrôle Négatif



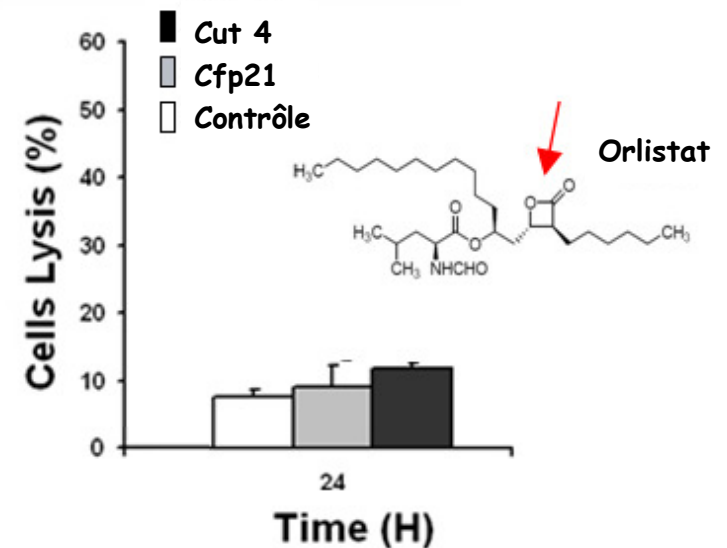
cfp21



Cut4



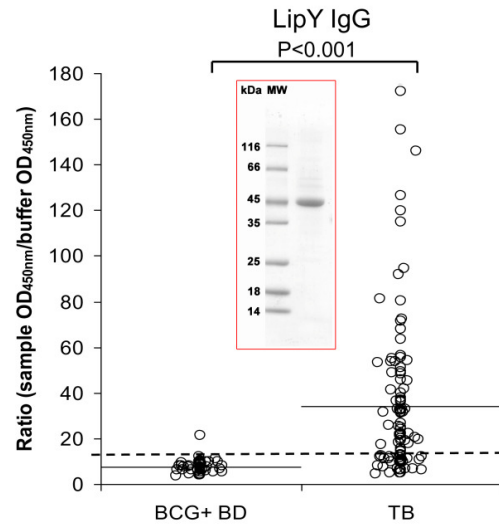
Cut4 + Orlistat



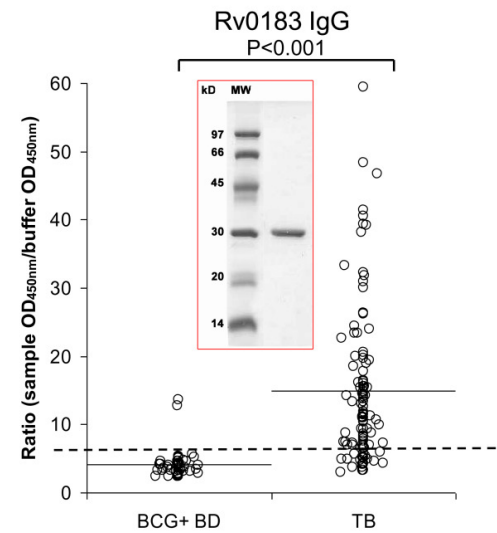
Enzymes lipolytiques : des outils de diagnostic

205 patients Polonais & Français (LTBI+, BCG+, TB+)

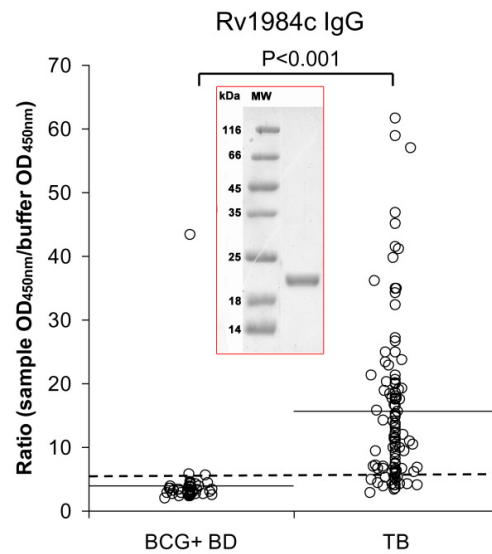
HSL-like
Triglycéride
lipase



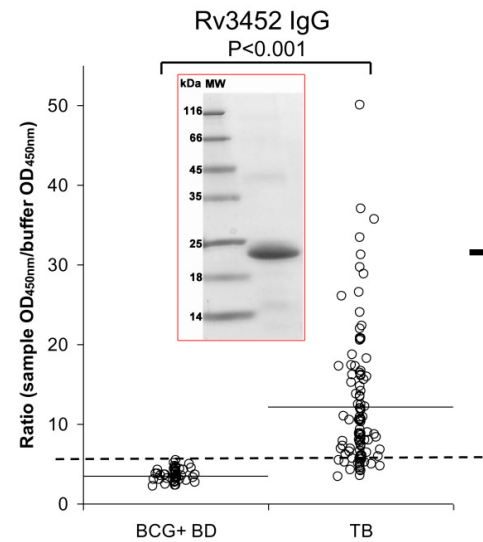
hMGL-like
Monoglycéride
lipase



Cfp21 Cutinase-like
avec une activité
lipase

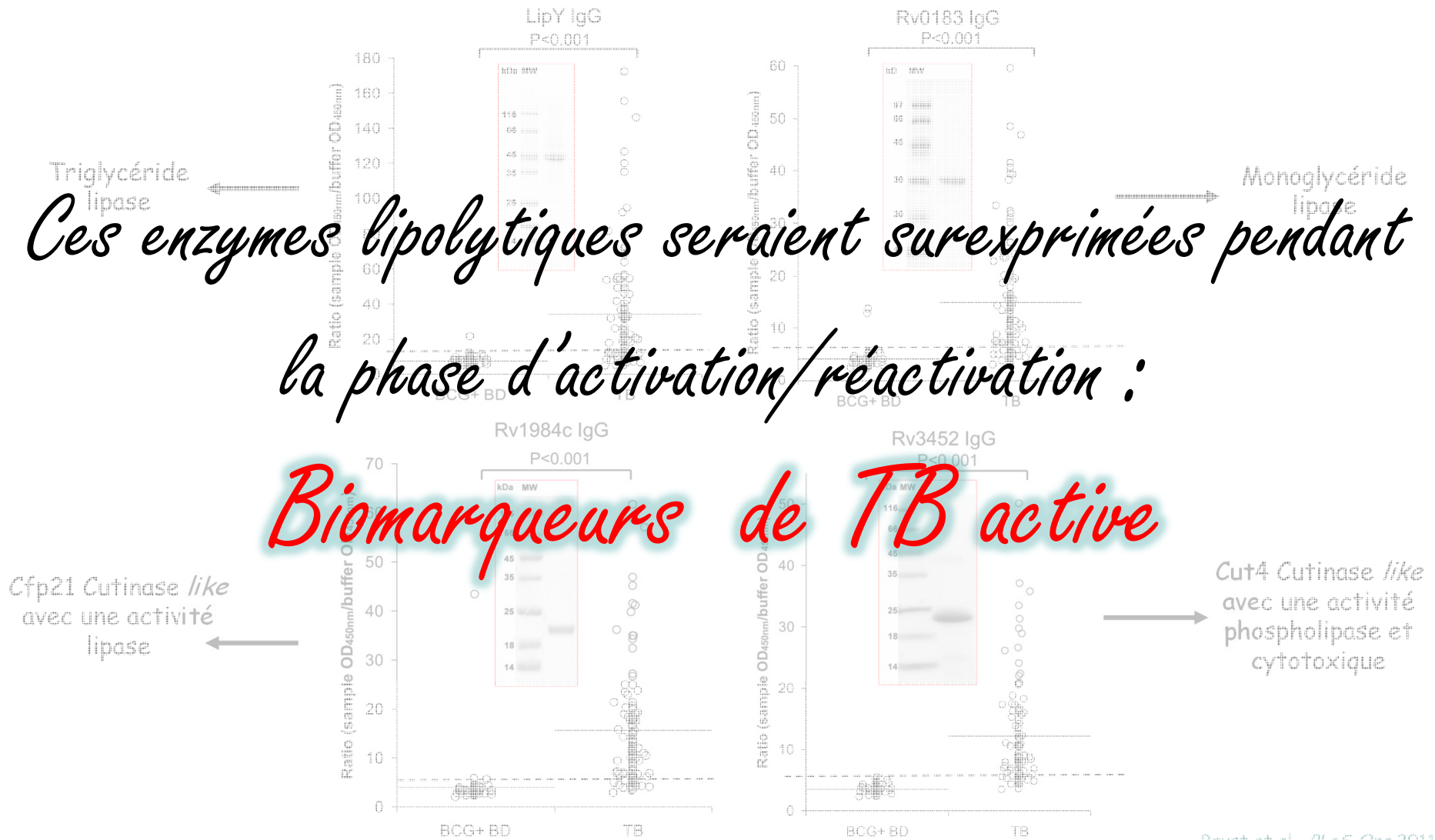


Cut4 Cutinase-like
avec une activité
phospholipase et
cytotoxique



Enzymes lipolytiques : des outils de diagnostic

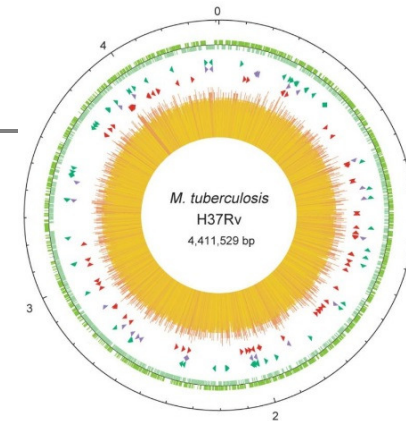
205 patients Polonais & Français (LTBI+, BCG+, TB+)





*Les inhibiteurs d'enzymes lipolytiques
des antituberculeux potentiels ?*

Gènes codant pour des enzymes lipolytique



Famille	Nombre de gènes
HSL-like (lipase hormono-sensible humaine)	12
Cutinase-like (cutinase de <i>Fusarium solani</i>)	7
hMGL-like (monoglyceride lipase humaine)	3
hCEH-like (carboxylester hydrolase humaine)	1
<i>Candida parapsilosis</i> Lip1 lipase	1
Phospholipases C	4

LipY → hydrolyse des lipides extra et intracellulaires

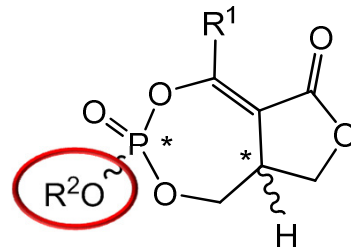
--- → Cutinase de *Fusarium solani*

Rv0183 → architecture de la paroi



Enzymes lipolytiques modèles

Les Cyclipostins & Cyclophostines



Cyclophostin: $R^1 = R^2 = \text{CH}_3$

Cyclipostins: $R^1 = \text{CH}_3$
 $R^2 = \text{C}_{15} \text{ to } \text{C}_{17}$

(12) **United States Patent**
Seibert et al.

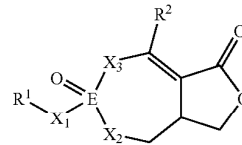
(10) **Patent No.:** US 7,923,438 B2
 (45) **Date of Patent:** Apr. 12, 2011

(54) **USE OF CYCLIPOSTIN DERIVATIVES FOR THE TREATMENT OF MYCOBACTERIAL INFECTIOUS DISEASES**

ABSTRACT

The invention relates to the use of a compound of the formula (I)

(75) Inventors: **Gerhard Seibert**, Frankfurt am Main (DE); **Luigi Toti**, Hochheim (DE); **Joachim Wink**, Frankfurt am Main (DE)



(73) Assignee: **Sanofi-Aventis**, Paris (FR)

(21) Appl. No.: 12/366,695

(22) Filed: Feb. 6, 2009

(65) **Prior Publication Data**

US 2009/0233884 A1 Sep. 17, 2009

Related U.S. Application Data

(63) Continuation of application No. PCT/EP2007/007159, filed on Aug. 14, 2007.

for the treatment of bacterial infections caused by mycobacteria, nocardia or corynebacteria, wherein E is phosphorus; X₁, X₂ and X₃ are oxygen; and R¹ and R² are as defined in the specification.

Inhibiteurs de lipases
 → bloquent la croissance de diverses mycobactéries

Inhibition zone size in mm

Compound tested	µg per disc	Mol mass g/mol	nmol per disc	Inhibition zone size in mm			
				<i>Mycobacterium phlei</i> (ATCC 1298)	<i>Nocardia brasiliensis</i> (ATCC 19296)	<i>Nocardia abscessus</i> (BAA 279)	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> (ATCC 27010)
Cyclipostin P	20	440.6	45	35	47	28	10
Cyclipostin T	20	468.7	43	30	38	9	12
Cyclipostin T2	20	468.7	43	47	39	10	20
Rifampicin	30	822.9	36	55	10	12	47
Penicillin G	6.25	372.5	17	0	0	16	33
Control	0	—	0	0	0	0	0
Disease	—	—	—	(A)	(B)	(B)	(C)

Les Cyclophostin et Cyclipostins

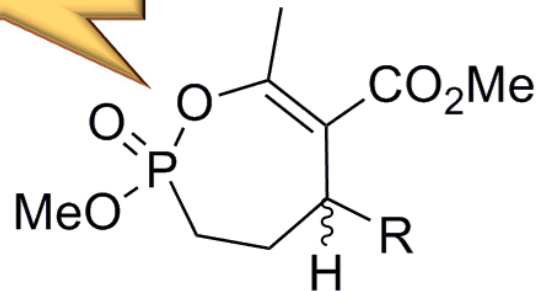
► Synthèse de 16 nouveaux composés

→ LipY, Rv0183, Cutinase et les lipases digestives de mammifères



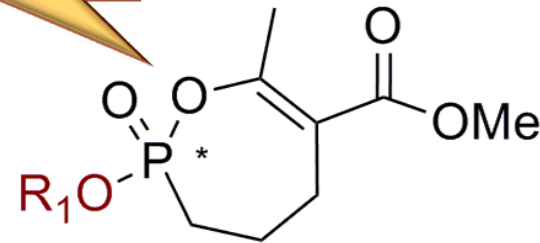
Dr. Chris Spilling

Cyclophostin



R = H, C₅, ...C₁₈

Cyclipostins

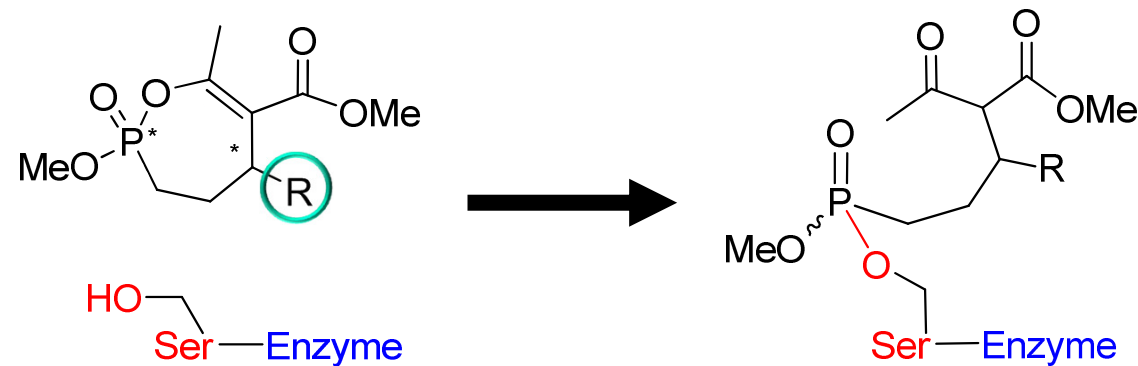


R₁ = C₁₆, C₁₈

*Inhibiteurs très puissants
et hautement sélectifs des lipases microbiennes*

Bilan inhibition *in vitro*

- ▶ Formation irréversible d'un complexe covalent enzyme/inhibiteur



- ▶ En jouant sur la lipophilie des composés (groupe **R**) il est possible de moduler leur pouvoir inhibiteur et surtout d'augmenter leur spécificité pour une enzyme cible.

*De tels inhibiteurs sélectifs représentent
des outils de choix pour comprendre
le rôle physiologique des enzymes lipolytiques
dans la croissance et la pathogénicité de *M. tuberculosis**



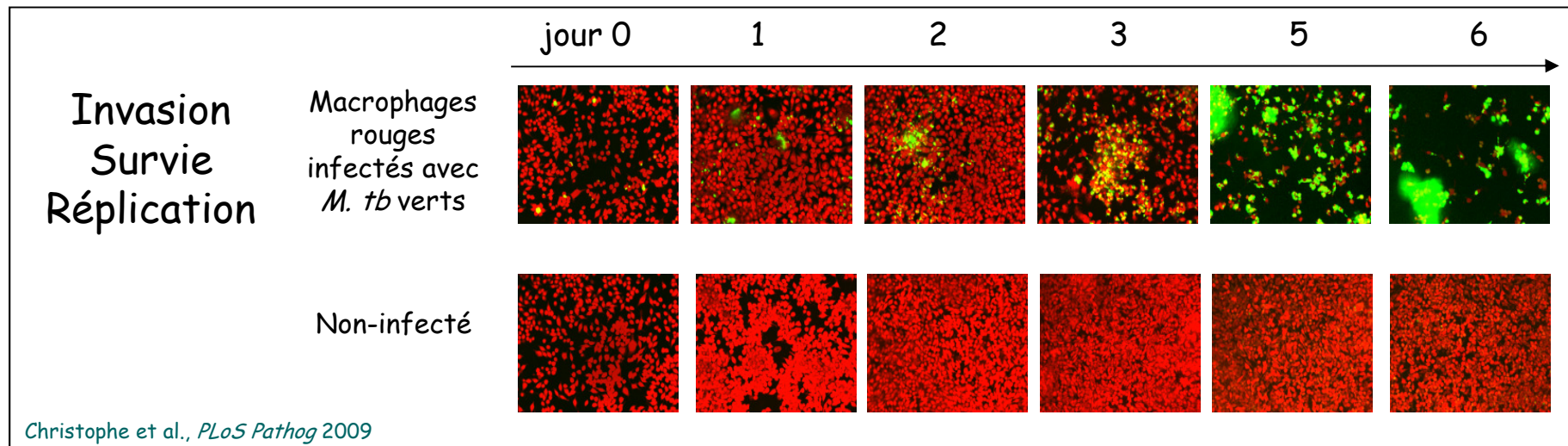
Résultats *ex-vivo* : plateforme haut débit

- ▶ Plateforme haut débit BSL-3
- ▶ Microscope de fluorescence pour lecteur de microplaques 384 puits
- ▶ Acquisition et analyse des images en automatique
- ▶ Quantification des images
- ▶ Analyse à très haut débit (~10000 échantillons/jour)

P. Brodin



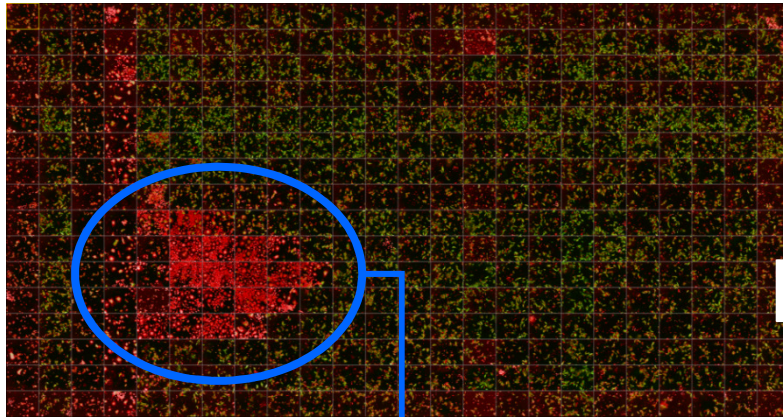
Centre d'Infection
&
d'Immunité de Lille



Résultats *ex-vivo* : plateforme haut débit

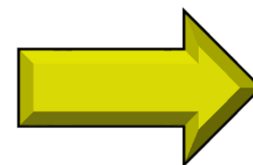
Vert : *M. tuberculosis* H37Rv GFP

Rouge : Macrophages colorés avec du Cyto60



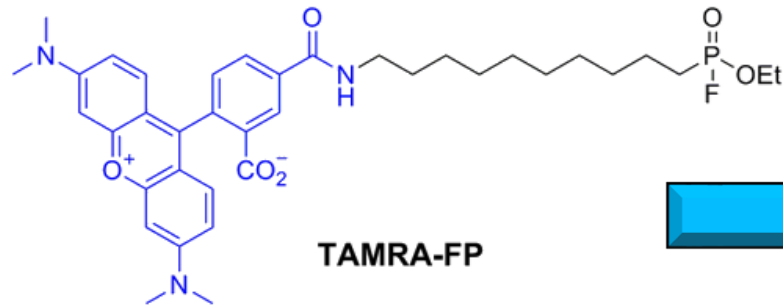
« Clearance »
de la bactérie

Compounds	Extracellular growth	Intracellular macrophage growth	
	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)
Isoniazid (INH)	1.2	1.2	>150
Ethionamide (ETH)	6.0	6.0	120
Rifampicin (RIF)	0.01	2.9	24
1	<i>No effect</i>	6.0	>100
2	≥100	4.0	>100
3	15-20	3.0	>100
4	30-50	4.0	>100
5	>100	10.0	>20
6	0.50	<i>No effect</i>	>100
7	24.4	<i>No effect</i>	>100
8	1.6	<i>No effect</i>	>100

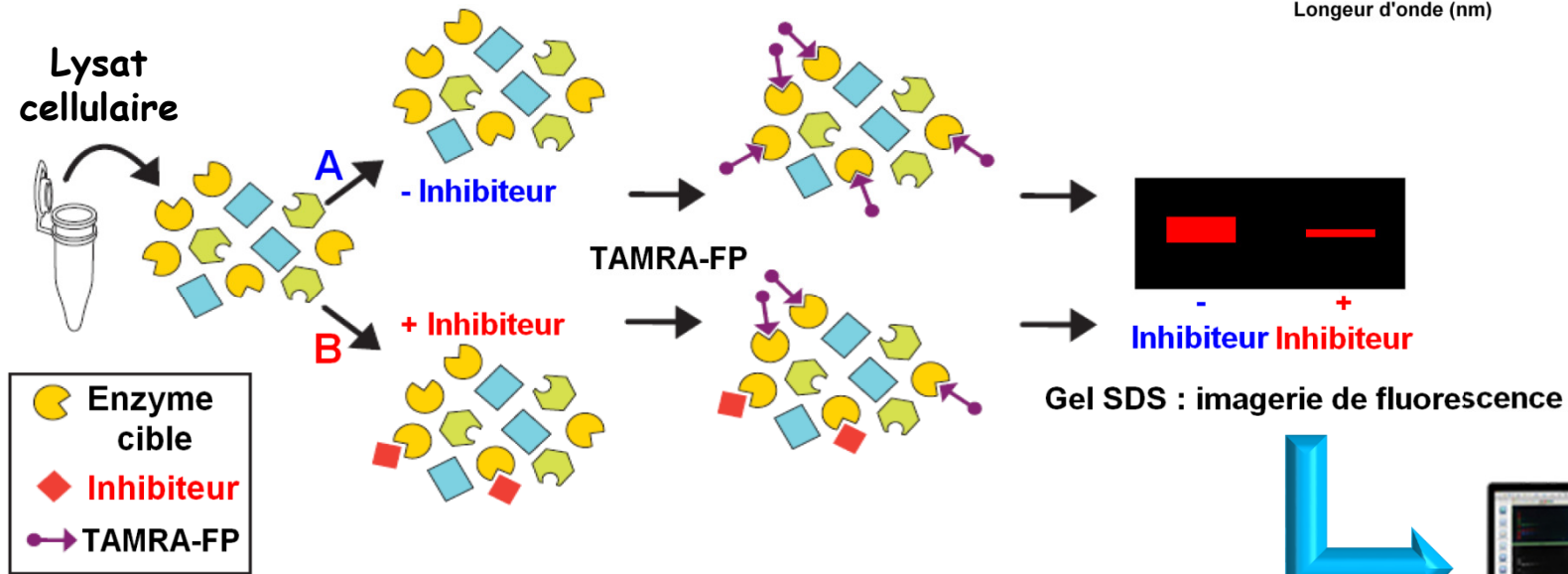
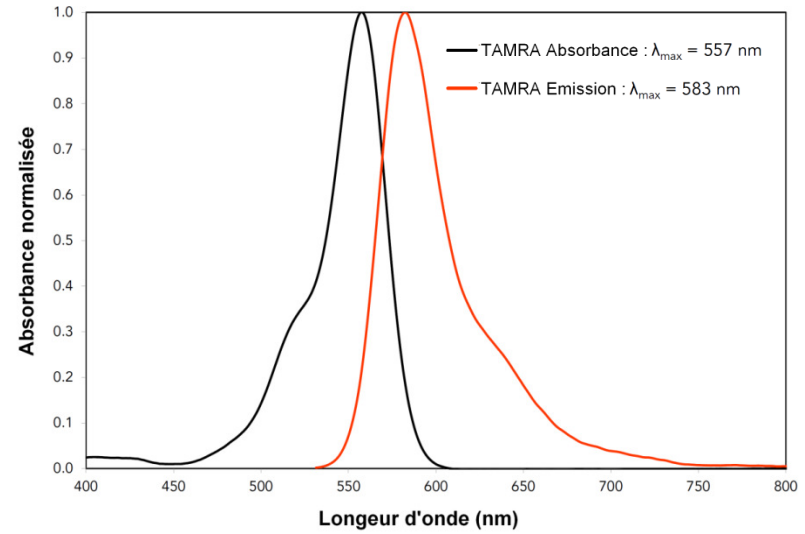


Enzymes réellement ciblées
par nos composés?

Identification des cibles



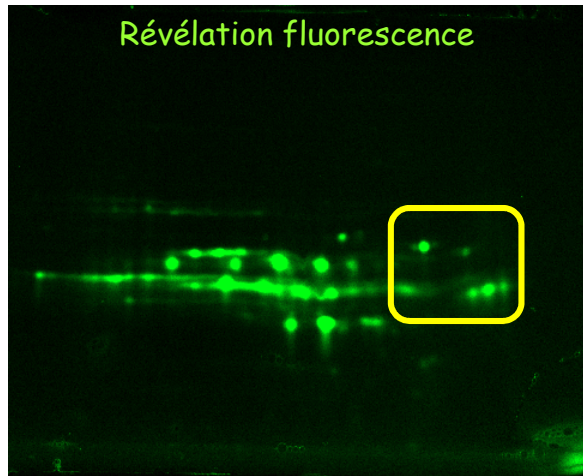
Sonde fluorescente :
carboxytétraméthylrhodamine



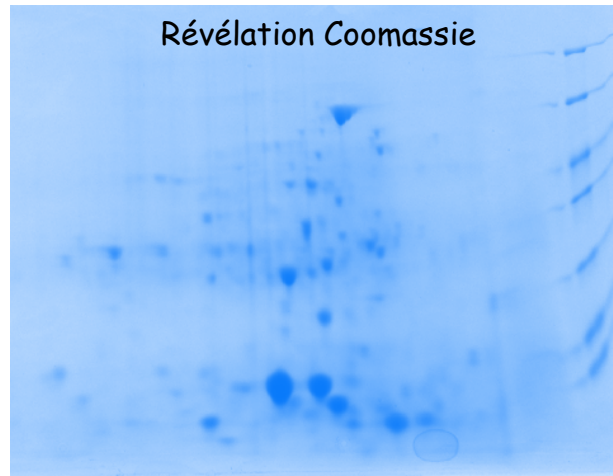
- Enzyme cible
- Inhibiteur
- TAMRA-FP



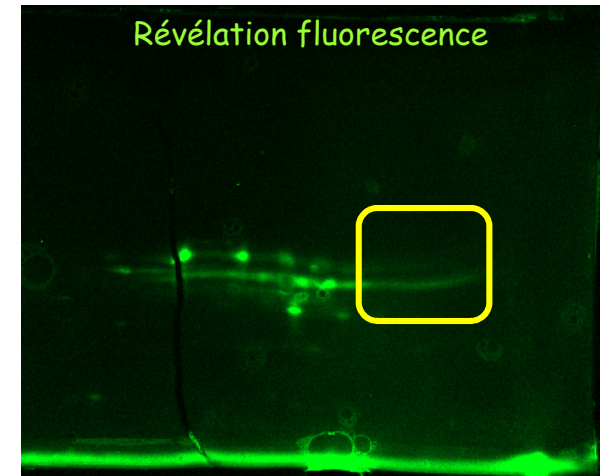
Identification des cibles : gel 2D



Révélation fluorescence



Révélation Coomassie



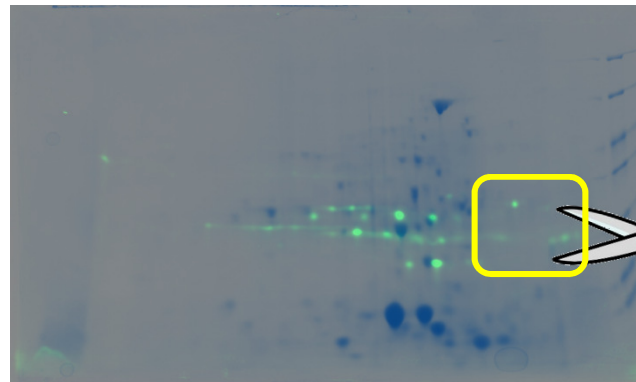
Révélation fluorescence

TAMRA-FP



Inhibiteur Inhibiteur

Gel SDS : imagerie de fluorescence



Inhibiteur 6 +

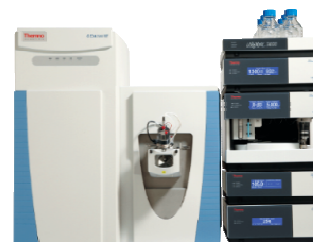
TAMRA-FP

Expériences

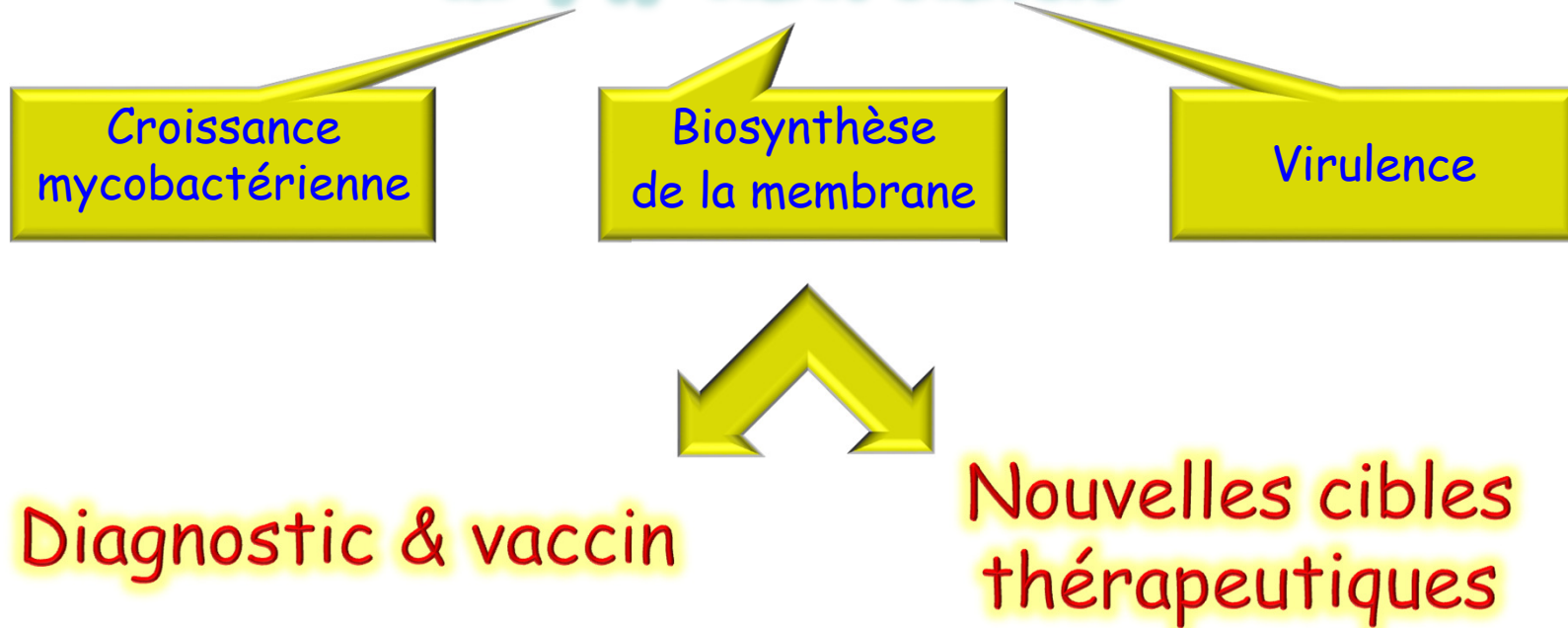
en cours...

Spots excisés

LC-MS/MS



*Rôle majeur des enzymes
lipolytiques dans le cycle de vie
de *M. tuberculosis**



Collaborations / Remerciements



Raj K. Malla
Benjamin P. Martin
Nigam P. Rath
Chris D. Spilling



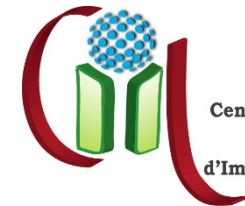
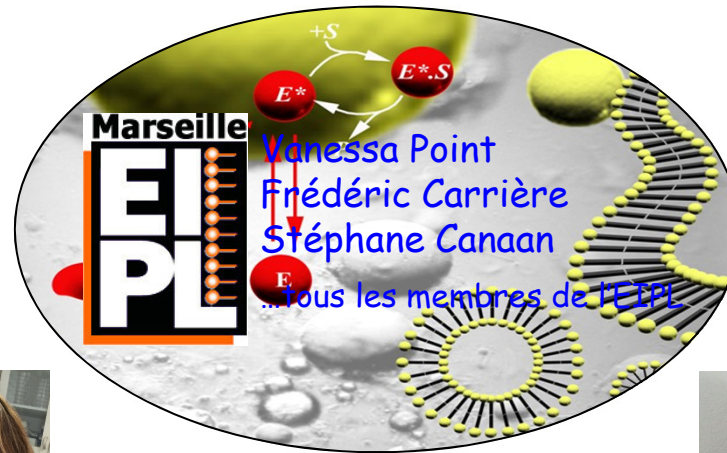
National Institute of
General Medical Sciences



MAP
Marseille Proteomique

IBISA
INFRASTRUCTURES
BIOLOGIE SANTE
ET AGRICULTURE

Plate-forme Protéomique
Régine Lebrun
Remy Puppo



Centre d'Infection
&
d'Immunité de Lille

Priscille Brodin
Vincent Delorme

