HAL
open science

Analyse protéomique et fonctionnelle des structures de Maurer, un compartiment sécrétoire de Plasmodium falciparum impliqué dans son développement érythrocytaire

Laetitia Vincensini

To cite this version:

Laetitia Vincensini. Analyse protéomique et fonctionnelle des structures de Maurer, un compartiment sécrétoire de Plasmodium falciparum impliqué dans son développement érythrocytaire. Biologie cellulaire. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2005. Français. NNT : . tel-00009549

HAL Id: tel-00009549

https://theses.hal.science/tel-00009549v1

Submitted on 21 Jun 2005

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.

Unité de Biologie des
Interactions Hôte-Parasite
CNRS URA 2581
Institut Pasteur
25, rue du docteur Roux
75724 Paris cedex 15

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PARIS VI

Spécialité
Parasitologie

Présentée par

Laetitia VINCENSINI

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR de l'UNIVERSITE PARIS VI

Analyse protéomique et fonctionnelle des structures de Maurer, un compartiment sécrétoire de *Plasmodium falciparum* impliqué dans son développement érythrocytaire

Présentée et soutenue publiquement le jeudi 21 avril 2005

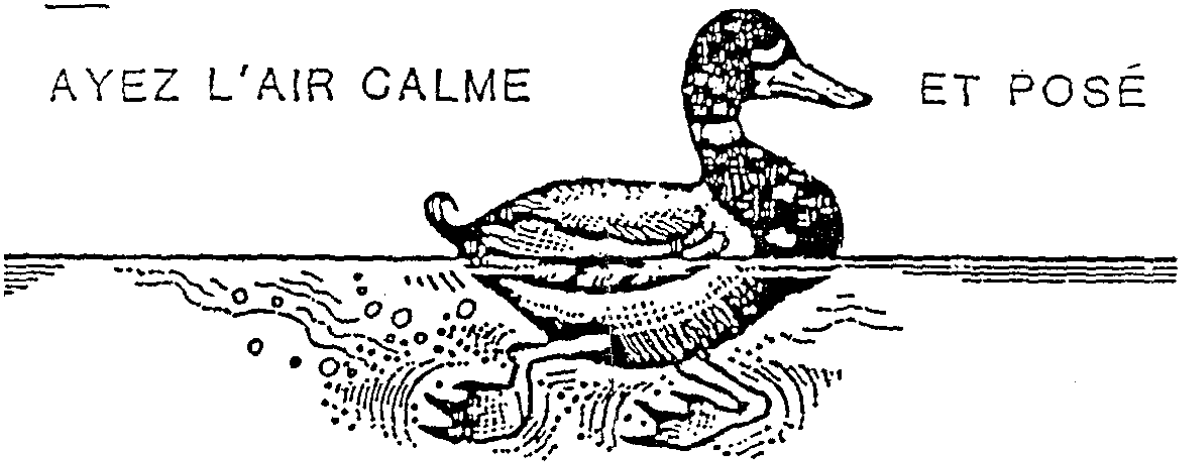
Devant le jury composé de :

Pr Dominique Mazier, *Présidente*
Dr Christian Doerig, *Rapporteur*
Dr Jean-François Dubremetz, *Rapporteur*
Dr Agathe Subtil, *Examinateur*
Dr Thierry Rabilloud, *Examinateur*
Pr Catherine Braun Breton, *Directrice de thèse*

SOYEZ COMME UN CANARD:

En surface...

AYEZ L'AIR CALME ET POSÉ



Sous la surface ***PÉDALEZ COMME LE MAUDIT!***

Remerciements

Je remercie Dominique Mazier de m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse. Vous avez eu l'occasion de suivre ce travail depuis le DEA, et votre avis critique sera important pour moi.
Je remercie chaleureusement Jean-François Dubremetz et Christian Doerig d'être rapporteurs de ma thèse, en dépit des délais parfois réduits…De congrès en séminaires, entre Lisbonne, Montpellier et Bruxelles, vous avez été parmi mes mentors au cours de ma dernière année de thèse. Je vous remercie pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail, pour votre investissement, et pour vos encouragements.
Je remercie également Thierry Rabilloud et Agathe Subtil d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse. J'attache beaucoup d'importance au fait de présenter mon travail en dehors du cercle – très fermé !- des parasitologues, et je vous remercie pour vos critiques et suggestions 'venues de l'extérieur'.

Mes remerciements les plus sincères vont à Catherine Braun Breton, qui a dirigé cette thèse d'une main de maître à cheval entre Paris et Montpellier. Catherine, merci d'avoir toujours été très disponible alors que ton emploi du temps relève parfois de la quadrature du cercle ! Merci de m'avoir incitée à m'ouvrir vers d'autres horizons scientifiques, et de m'avoir toujours encouragée à concilier ma vie de thésarde avec nombre d'autres activités (dont les vacances !). Merci de la confiance que tu m'as accordée à plusieurs reprises, notamment lorsque je suis restée à Paris pour terminer ma thèse, ou quand je suis partie à Woods Hole l'été dernier. Je te suis très reconnaissante de m'avoir enseigné la rigueur dans le travail, sans pour autant en négliger le côté ludique.
Je tiens également à exprimer ma plus vive reconnaissance à Artur Scherf, grâce à qui j'ai pu terminer ma thèse à l'Institut Pasteur dans des conditions idéales. Merci d'avoir accepté que je demeure l'ultime représentante du groupe de Catherine au sein de BIHP, pendant plus d'un an !

Je remercie aussi Denise Mattéi de l'intérêt qu'elle a témoigné à mon travail, et, plus généralement, merci de l'intérêt que tu portes à la bonne marche du laboratoire. C'est aussi toi qui m'as initiée aux vertus de la caipirinha !

Il m'est difficile de trouver les mots justes pour remercier Thierry Blisnick. Thierry, tu as accompagné mon parcours au laboratoire dès les premiers jours, partageant la joie des bonnes nouvelles comme la déception des manips ratées. Merci infiniment pour ta patience face à mes questions incessantes, merci de m'avoir appris tous les trucs et astuces indispensables pour espérer, un jour, 'dompter les protéines' ! Merci pour ton investissement dans mon travail et pour ton aide précieuse, qui s'est transformée sur la fin en une assistance téléphonique permanente. La bonne humeur que tu distilles quotidiennement, ton optimisme et tes encouragements ont été extrêmement précieux, et je sais qu'ils m'accompagneront encore longtemps.

Un grand merci à Jean-Christophe Barale ; merci JC pour ta disponibilité, pour ton humour, pour les discussions scientifiques, touristiques, économiques, 'parapentesques' et autres…

Merci aussi à Pierrick Uzureau, mon 'compagnon de cubicule' pendant les premières années. Je garde un excellent souvenir de nos discussions impromptues et des séances de papotage intense ! C'est aussi toi qui m'as initiée au monde mystérieux de l'informatique : merci pour ta patience, je crois que n'importe qui d'autre se serait arraché les cheveux…

Un immense merci à Stuart Ralph. Nos longues discussions qui commencent –parfois- avec de la science pour diverger ensuite vers Vermeer ou James Herriots vont me manquer…Merci pour ta disponibilité, tes nombreux coups de main, et aussi et surtout ta fantastique joie de vivre !

Marta, tu as toujours été présente quand j'avais besoin d'une oreille attentive ou simplement envie de me changer les idées. Merci pour ton écoute et tes conseils avisés. Bonne chance pour la suite !

Yvon, merci pour tes conseils toujours avisés… Grâce à toi je sais aussi où acheter le meilleur kouign aman de Paris !

Christine, merci pour ta bonne humeur et l'intérêt que tu portes au bien-être de chacun. Je ne pourrai plus manger de crème brûlée sans penser à toi !

Solange, merci pour ton soutien amical et nos longues discussions.

Merci à Josy, qui s'occupe de nos petits tracas administratifs avec autant de gentillesse et nous fait rêver avec ses récits d'Australie…

Merci à Catherine (seconde compagne de cubicule), Benoît, Nicki, Alisson (bientôt papa !), Paola et Liliana pour leur bonne humeur quotidienne et leur soutien amical. Merci pour vos cours de chant, d'espagnol et d'équitation…
Et merci aussi aux membres passés de BIHP que j'ai toujours grand plaisir à revoir, ici ou ailleurs : Junior, Lindsay, Luisa, Laurence, Adéla…
Un grand merci à Thierry Rabilloud, avec qui nous avons eu une riche collaboration. Je te remercie pour tes conseils donnés à distance, ainsi que de m'avoir accueillie à Grenoble pour m'initier aux joies de la protéomique… et aussi aux délices des liqueurs de la distillerie Meunier !
Merci aussi à Sophie Richert et Emmanuelle Leize pour leur fructueuse collaboration.
Je remercie également Henri Vial et tous les membres de l'UMR 5539 à Montpellier pour leur accueil chaleureux.

Je remercie infiniment Monsieur Lacoste dont le soutien financier m'a permis d'achever ce travail. Merci aussi pour votre bienveillance et l'intérêt que vous avez porté à mes travaux.

Je ne peux ici remercier tous mes amis pour leur amitié qui m'est si importante : merci aux copines de Lyon pour les dîners gastronomiques et tout le reste ; merci à mes amis du Songe d'une nuit d'été pour tant de bons moments partagés et de crises de fou rire ; merci à Cécile et Nicolas pour les plans couscous de derrière les fagots… et merci aussi à tous ceux que je ne citerai pas.
Je voudrais enfin remercier ma famille pour sa bienveillance, sa compréhension et ses encouragements. Et merci Dan d'avoir toujours veillé à ce que je ne perde pas de vue les choses importantes de la vie…

Liste des publications

Article 1 :

Blisnick, T[1]., L. Vincensini[1], J.C. Barale[1,3], A. Namane[1,2] and C. Braun Breton[1,4].
"LANCL1, an erythrocyte protein recruited to the Maurer's clefts during *Plasmodium falciparum* development."
Sous presse dans *Molecular and Biochemical Parasitology*.

Manuscrit 2 :

Blisnick, T[1]., L. Vincensini[1], G. Fall[4] and C. Braun Breton[1,4].
"*Plasmodium falciparum* PP1 phosphatase, an essential enzyme located in the Maurer's clefts is involved in merozoite release."
Soumis à *Cellular Microbiology*.

Manuscrit 3 :

Vincensini L[1]., T. Blisnick[1], S. Richert[5], E. Leize-Wagner[5], A. Van Dorsselaer[5], BF. Cravatt[6] and Braun Breton C[1, 4].
" Proteomic analysis identifies RhopH2 as a putative serine hydrolase of the Maurer's clefts, a secretory compartment delivering *Plasmodium falciparum* proteins to the surface of its host cell."
En préparation

Article 4 :

Vincensini L[1]., S. Richert[5], T. Blisnick[1], A. Van Dorsselaer[5],E. Leize[5], T. Rabilloud[7] and C. Braun Breton[1,4].
"Proteomic analysis identifies novel proteins of the Maurer's clefts, a secretory compartment delivering *Plasmodium falciparum* proteins to the surface of its host cell."
Article sous presse dans *Molecular and Cellular Proteomics*.

[1]Unité de Biologie des Interactions Hôte-Parasite, CNRS URA 2581, Institut Pasteur, Paris
[2] Génopole, Plate-forme de protéomique, Institut Pasteur, Paris
[3] Unité d'Immunophysiopathologie Infectieuse, CNRS URA 1961, Institut Pasteur, Paris
[4] UMR 5539 CNRS-Université Montpellier 2
[5] Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio Organique, Université Louis Pasteur, Strasbourg
[6] The Skaggs Institute for Chemical Biology, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA
[7] Laboratoire de Bioénergétique Cellulaire et Pathologique, CEA, Grenoble

Liste des abréviations

BFA	Bréfeldine A
CLAG	*Cytoadherence Linked Asexual Gene*
COP	*Coat Protein Complex*
DRM	*Detergent Resistant Membrane*
DTT	Dithiothréitol
GFP	*Green Fluorescent Protein*
GPI	Glycosyl phosphatidyl inositol
GST	Gluthatione-*S*-Transférase
HRP-1	*Histidine Rich Protein -1*
HSP	*Heat Shock Protein*
kDa	kilodalton
LANCL1	*Lantibiotic synthetase component C like protein*
LysD4	Lysine deutérée (substituée par 4 atomes de Deuterium)
MSP-1	*Merozoite Surface Protein 1*
nanoLC-MS/MS	chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse et spectromètre de masse en tandem
NSF	*N-ethylmaleimide Sensitive Fusion protein*
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PDI	*Protein Disulfide Isomerase*
Pexel	Plasmodium *export element*
PfCDPK1	P. falciparum *calcium dependant protein kinase*
*Pf*EMP-1, -2,-3	P. falciparum *Erythrocyte Membrane Protein -1,-2, -3.*
PfExp1	P. falciparum *exported protein 1*
PfSBP1	P. falciparum *Skeleton Binding Protein 1*
PP1	Protéine phosphatase de type 1
RAP	*Rhoptry associated protein 1*
RE	Réticulum Endoplasmique
RESA	*Ring-stage Erythrocyte Surface Antigen*
RhopH	*High Molecular Mass Rhoptry complex*
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
SDS-PAGE	*SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis* (gel d'électrophorèse de polyacrylamide en condition dénaturante)
SNARE	*Soluble NSF Attachment Protein Receptor*

STEVOR	*Sub-Telomeric Variable Open Reading frame*
TVN	*Tubo Vesicular Membrane Network*

Liste des Figures et Tableaux

Figure 1 : Carte de répartition du paludisme dans le monde : évolution depuis 1900.....17

Figure 2 : Représentation de la répartition géographique et de la prévalence du paludisme dans le monde.....17

Figure 3 : Cycle de développement de *Plasmodium falciparum*, et liste des antigènes étudiés dans le cadre du développement d'un vaccin antipaludique.....19

Figure 4 : Formation d'une vésicule enrobée de protéines de la famille COPII à la surface du RE….....33

Figure 5 : Organisation de l'ancre GPI chez *P. falciparum* 36

Figure 6 : Organisation des *lipid rafts* au sein d'une membrane. 39

Figure 7 : Formation d'une vésicule enrobée de protéines de la famille COPI à la surface de l'appareil de Golgi. 44

Figure 8 : Mécanisme moléculaire de la fusion membranaire mettant en jeu les protéines SNARE….....46

Figure 9 : Morphologie des structures de Maurer observée en microscopie électronique…. 55

Figure 10 : Les structures de Maurer apparaissent comme des domaines particuliers du TVN…... 57

Figure 11 : Organisation de la protéine LANCL1. 95

Tableau 1 : Différentes familles de drogues et leur cible biologique.....23

Tableau 2 : Marqueurs protéiques de l'appareil de Golgi identifiés et caractérisés chez *P. falciparum*. 35

Tableau 3 : Caractérisation des préparations de fantômes de globules rouges sains et parasités par immunoempreinte et imunofluorescence.....76

Tableau 4 : Protéines identifiées par spectrométrie de masse au sein des préparations de fantômes de globules rouges parasités.....204

Table des matières

Liste des publications **5**

Liste des abréviations **6**

Liste des Figures et Tableaux **8**

Table des matières **9**

Préambule **14**

Introduction **15**

I- Généralités sur le paludisme **15**

1-- Le paludisme dans le monde et son impact **15**

1-1 Epidémiologie du paludisme 15

1-2 L'impact du paludisme sur le développement 15

2-- L'agent étiologique du paludisme **18**

3-- Une maladie réémergente **20**

4-- Les stratégies de lutte contre le paludisme **21**

4-1 : Lutte contre le vecteur 21

4-2 : Lutte contre le parasite 21

4-2-1 Les vaccins 21

4-2-2 Les drogues 23

5-- La nécessité de recherche de nouvelles cibles thérapeutiques **24**

6-- L'intérêt d'étudier le transport des protéines plasmodiales **25**

II- Le transport intracellulaire des protéines chez *P. falciparum* **28**

1-- Le Reticulum Endoplasmique, première étape de tri des protéines sécrétées **28**

1-1 Transport des protéines de sécrétion à travers la membrane du RE 28

1-1-1 Caractéristiques du peptide signal 28

1-1-2 La particule de reconnaissance du signal et le franchissement de la membrane du RE 29

1-1-3 Clivage du peptide signal 30

1-1-4 Topologie des protéines trans-membranaires 30

1-2 Modifications post-traductionnelles des protéines dans le RE 30

1-2-1 Formation de ponts disulfure 31
1-2-2 Reploiement correct des chaînes peptidiques 31
1-3 La sortie des protéines hors du RE 31
1-3-1 Quelles protéines quittent le RE ? 31
1-3-2 Le transport vésiculaire entre le RE et l'appareil de Golgi 32

2-- L'appareil de Golgi de *P. falciparum* 33
2-1 Caractérisation de l'appareil de Golgi de *P. falciparum* 34
2-1-1 Organisation structurale de l'appareil de Golgi de *P. falciparum* 34
2-1-2 Caractérisation biochimique de l'appareil de Golgi de *P. falciparum* 35
2-2 Le fonctionnement de l'appareil de Golgi de *P. falciparum* 35
2-2-1 La glycosylation des protéines s'achève dans l'appareil de Golgi 35
2-2-1-1 Les ancrages GPI 35
2-2-1-2 Les N-glycosylations 37
2-2-2 Le tri des protéines, au niveau du trans-Golgi 37
2-2-2-1 Adressage selon la voie du transport basolatéral 38
2-2-2-2 Adressage aux membranes apicales : mise en jeu des *lipid rafts* 39
2-2-2-3 : Le rôle des *rafts* dans un érythrocyte parasité par *P. falciparum* 40
2-2-2-4 Adressage vers les granules de sécrétion 41
2-2-2-5 Adressage de protéines parasitaires vers l'apicoplaste 42
2-2-3 Aspects moléculaires du transport vésiculaire 43
2-2-3-1 La formation de vésicules à la surface de l'appareil de Golgi 43
2-2-3-2 L'attachement et la fusion des vésicules avec la membrane cible 44
2-2-4 La sécrétion par défaut à la sortie de l'appareil de Golgi de *P. falciparum* 46
2-2-4-1 La vacuole parasitophore 46
2-2-4-2 La sécrétion des protéines se fait par défaut dans la vacuole parasitophore 47

III- L'adressage et le transport de protéines hors du parasite 49

1- L'adressage au-delà de la membrane de la vacuole parasitophore 49
1-1 Pexel, le signal d'export dans le cytoplasme du globule rouge 49
1-2 L'adressage dépend aussi du moment auquel est synthétisée la protéine 51
1-3 Rôle possible des modifications lipidiques des protéines et des *lipid rafts* 51

2- Les structures membranaires dans le cytoplasme du globule rouge 52
2-1 Le *Tubo-Vesicular Membrane Network*, une structure participant à l'import de molécules 53
2-2 Les structures de Maurer 53
2-3 Les structures de Maurer sont-elles en continuité avec le TVN? 55
2-3-1 Les structures de Maurer ont des caractéristiques de vésicules isolées… 55
2-3-2 …mais plusieurs arguments suggèrent que les structures de Maurer sont des domaines particuliers du TVN 56
2-3-3 Comment expliquer et étudier la formation de compartiments au sein du TVN ? 59

3- Les structures de Maurer participent au transport des protéines vers la membrane érythrocytaire 60

3-1 Un transport vésiculaire dans le cytoplasme du globule rouge ? 61

3-2 Un continuum membranaire dans le cytoplasme du globule rouge ? 62

3-3 Vers une réalité plus complexe 63

IV Les structures de Maurer, un compartiment sécrétoire original 65

1- Les structures de Maurer constituent le premier exemple d'un appareil de sécrétion exporté par un parasite dans le cytoplasme de sa cellule hôte 65

2- Les protéines intervenant –ou susceptibles d'intervenir- dans la variation antigénique sont associées aux structures de Maurer 66

2-1 PfEMP1 66

2-2 RIFIN 67

2-3 STEVOR 67

3-- Les structures de Maurer contiennent des protéines impliquées dans des processus de signalisation cellulaire 68

4- Les structures de Maurer contiennent de nombreuses protéines basiques, dont la fonction est inconnue 68

4-1 La famille SEP/etramp 68

4-2 La famille PfMC-2TM 69

4-3 D'autres protéines basiques des structures de Maurer : PfSBP1 et MAHRP-1 70

5- Une nouvelle famille de structures de Maurer au stade gamétocyte ? 71

6- Les structures de Maurer pourraient participer au processus de libération des mérozoïtes 71

V- Présentation du sujet de thèse 74

1- Pré requis : mise au point d'une méthode de préparation des structures de Maurer 74

2 – Analyse fonctionnelle des structures de Maurer : étude de l'interaction entre la protéine PfSBP1 et une protéine cytoplasmique 76

3 – Pourquoi une approche protéomique ? 77

4- Approche protéomique fonctionnelle, appliquée aux hydrolases à sérine 78

5 – Analyse protéomique globale des structures de Maurer 79

Chapitre 1 : Etude fonctionnelle de PfSBP1, protéine transmembranaire des structures de Maurer **81**

I- Etude de l'interaction entre PfSBP1, protéine transmembranaire des structures de Maurer, et son partenaire érythrocytaire LANCL1 82

Introduction à l'article 1 82

Article 1 : LANCL1, an erythrocyte protein recruited to the Maurer's clefts during *Plasmodium falciparum* development. 84

Discussion de l'article 1 94

II- Etude des modifications post-traductionnlles de PfSBP1 et de leur importance fonctionnelle.....97

Introduction au manuscrit 2 97

Manuscrit 2 : PP1 phosphatase, a *Plasmodium falciparum* essential enzyme, is exported to the host cell and implicated in the release of infectious merozoites. 99

Discussion du manuscrit 2 133

Discussion générale et conclusion du chapitre 1.....138

Chapitre 2 : Analyse protéomique fonctionnelle des fantômes de globules rouges parasités, appliquée aux hydrolases à sérine.....141

Introduction.....141

Manuscrit 3 : Proteomic analysis identifies RhopH2 as a putative serine hydrolase of the Maurer's clefts, a secretory compartment delivering *Plasmodium falciparum* proteins to the surface of its host cell. 145

Discussion 172

Chapitre 3 : Analyse protéomique globale des fantômes de globules rouges parasités et des structures de Maurer.....181

Introduction.....181

Article 4 : Proteomic analyses identify novel proteins of the Maurer's clefts, a secretory compartment delivering *Plasmodium falciparum* proteins to the surface of its host cell 185

Discussion de l'article 4.....202

1- Identification de protéines parasitaires marquées à la lysine deutérée 202

2- Identification de protéines hypothétiques localisées dans les structures de Maurer..... 206

3- Adressage des protéines aux structures de Maurer **208**

4- L'identification de certaines protéines indique que les structures de Maurer ont des fonctions biologiques variées **210**

Conclusion **213**

Conclusion générale et perspectives **215**

Références bibliographiques **221**

Préambule

Mon travail de thèse est centré sur l'étude des structures de Maurer, un compartiment sécrétoire original de *Plasmodium falciparum*. Ce compartiment, qui présente des caractéristiques d'un appareil de Golgi, est localisé dans le cytoplasme de la cellule hôte et assure le transfert de protéines parasitaires à la membrane érythrocytaire. Les structures de Maurer participent notamment au transport des protéines parasitaires liées au phénomène de cytoadhérence, qui est à l'origine du neuropaludisme. Nous avons entrepris une étude protéomique et fonctionnelle de ce compartiment afin de mieux comprendre son rôle biologique et d'identifier des enzymes essentielles au parasite.

L'introduction de ce manuscrit replace notre étude dans le cadre plus général de la problématique de la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques, des interaction entre la cellule hôte et le parasite, et du transport intracellulaire des protéines. Nous avons distingué le transport intracellulaire au sein du parasite, et le transport des protéines entre la membrane plasmique du parasite et la membrane plasmique de l'érythrocyte. Dans le premier chapitre nous avons regroupé les travaux portant sur l'étude fonctionnelle de PfSBP1, protéine transmembranaire des structures de Maurer. Nous avons caractérisé les interactions protéiques que PfSBP1 établit d'une part avec LANCL1, une protéine du squelette sous-membranaire érythrocytaire, et d'autre part avec une phosphatase parasitaire. Ceci permet de préciser les modalités d'interaction entre les structures de Maurer et la membrane plasmique de la cellule hôte et démontre le rôle des structures de Maurer dans le phénomène de libération des mérozoïtes. Le second chapitre décrit l'étude protéomique fonctionnelle des fantômes de globules rouges parasités centrée sur les sérylhydrolases. Nous avons identifié dans les structures de Maurer la protéine de rhoptries RhopH2 dont nous poursuivons la caractérisation. Le troisième chapitre est consacré à l'étude protéomique globale des fantômes de globules rouges parasités et des structures de Maurer. Cette analyse a identifié près de 50 protéines parasitaires dans des préparations de fantômes de globules rouges parasités, et ces données éclairent d'un jour nouveau le rôle des structures de Maurer et ouvrent la voie à des analyses fonctionnelles de leurs composants et à l'identification des composants de la machinerie de transport des protéines du parasite vers et à partir de ces structures.

Introduction

I- Généralités sur le paludisme

1-- Le paludisme dans le monde et son impact

1-1 Epidémiologie du paludisme

Le paludisme est une maladie parasitaire présente à l'état endémique dans une centaine de pays de la zone subtropicale (Figure 1). Plus de la moitié de la population mondiale y est exposée, ce qui correspond à une hausse de près de 10 % au cours de la dernière décennie (Hay, Guerra *et al*. 2004). Parmi les 300 à 500 millions de cas annuels recensés, 1,1 à 2,7 sont mortels. Comme l'indique la carte de la figure 2, qui donne une représentation visuelle de la répartition géographique et du nombre de cas de paludisme dans le monde, plus de 90 % des cas surviennent en Afrique subsaharienne et en Inde (OMS 2004). Mais la prévalence du paludisme n'est pas homogène selon les classes d'âge. En zone d'endémie, les victimes du paludisme sont essentiellement les enfants de moins de cinq ans : ensuite, l'enfant qui a grandi en zone d'endémie a acquis une certaine immunité protectrice, qui sera préservée tant qu'il sera régulièrement au contact du parasite. Les autres populations à risque sont les femmes enceintes, les populations déplacées, les réfugiés, et les voyageurs non immuns.

1-2 L'impact du paludisme sur le développement

L'Organisation Mondiale de la Santé estime que le paludisme constitue, avec le VIH-SIDA et la tuberculose, l'un des principaux problèmes de santé publique menaçant le développement des pays les plus pauvres. Dans cette optique, une étude récente a cherché à évaluer l'impact économique du paludisme et en souligne ses effets à long terme (Malaney, Spielman *et al.* 2004). La première approche consiste à examiner l'impact du paludisme au niveau individuel. Ces études évaluent la diminution du revenu des ménages atteints par la maladie

(absentéisme, perte d'emploi, coûts des soins…) et ses conséquences sur la croissance économique. Elles chiffrent généralement la perte d'activité liée à la maladie à environ 1 point de Produit Intérieur Brut (PIB) par habitant. Les effets macroéconomiques, à l'échelle de la société, seraient cependant bien plus importants. Le développement de la maladie modifie en effet les comportements des acteurs économiques et sociaux bien au-delà des effets purement individuels. Ainsi, les investisseurs étrangers hésitent à investir dans des pays dangereux pour leurs experts et dans lequel les salariés risquent d'être touchés par la maladie. Dans un contexte de globalisation et de concurrence accrue, le développement du paludisme risque de marginaliser les zones infectées. De même, le tourisme, qui constitue pour certains pays en développement une part importante du revenu, est évidemment affecté. La situation est probablement encore plus inquiétante pour l'avenir, puisque le paludisme éteint peu à peu les trois moteurs de la croissance. En effet, le progrès technique est pénalisé par un surinvestissment public dans les dépenses de santé au détriment de dépenses porteuses de richesse pour l'avenir comme la recherche et le développement. De plus, l'épargne des ménages est également diminuée, du fait de la part importante des revenus consacrée aux soins, ce qui pèse sur l'investissement et limite l'accumulation de capital productif. Enfin, la formation professionnelle de la population active est limitée à cause du paludisme, qui atteint énormément les enfants en bas âge, ce qui affecte leur assiduité et leurs résultats scolaires. Les études macroéconomiques qui intègrent l'ensemble de ces effets suggèrent que le paludisme pourrait conduire à une réduction de moitié du PIB par tête à terme. Ces différentes estimations doivent guider la mise en place de politiques de santé publique adaptées à l'ampleur de l'impact du paludisme sur le développement économique.

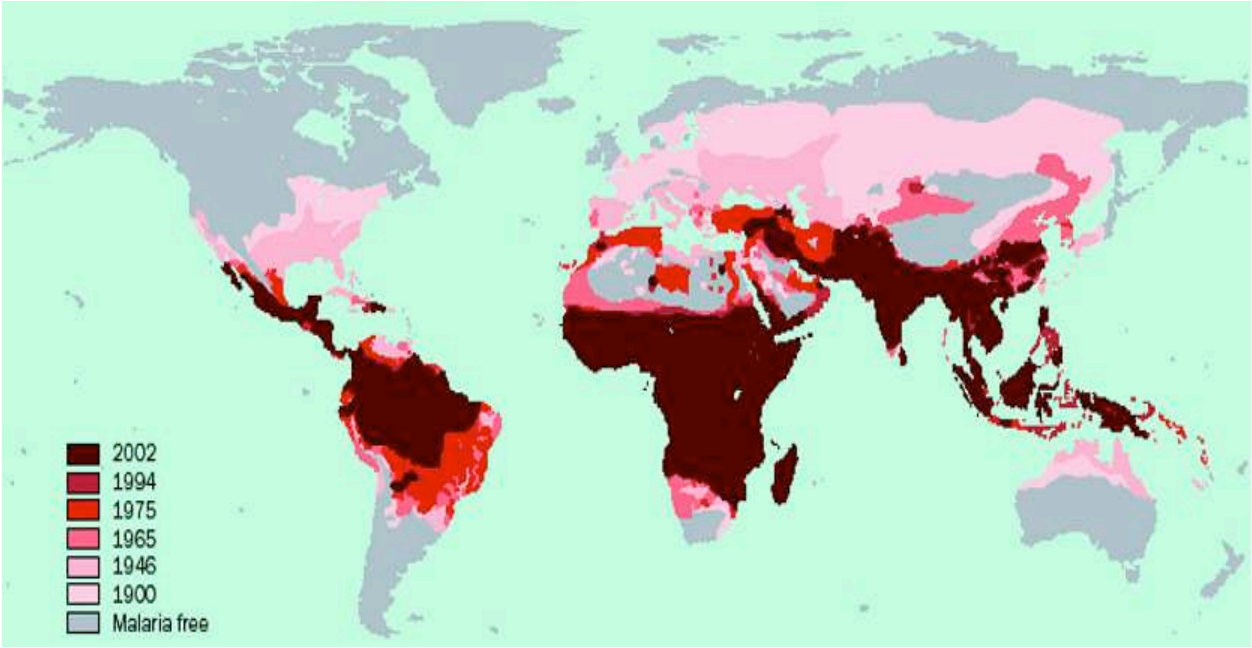


Figure 1 : Carte de répartition du paludisme dans le monde : évolution depuis 1900.
D'après (Hay, Guerra *et al*. 2004).

Figure 2 : Représentation de la répartition géographique et de la prévalence du paludisme dans le monde.
La surface occupée sur la carte par chaque pays est proportionnelle au nombre de cas annuels de paludisme. D'après (Hay, Guerra *et al*. 2004).

2-- L'agent étiologique du paludisme

Le paludisme est causé par un Protozoaire parasite du genre *Plasmodium*, appartenant au phylum des Apicomplexes. Ce phylum est défini à partir d'un certain nombre de critères morphologiques, notamment la présence d'un complexe apical impliqué dans l'invasion de cellules Eucaryotes, formé du conoïde, d'un anneau polaire, et d'organites de sécrétion : rhoptries, granules denses, micronèmes. Les Apicomplexes possèdent également un plaste non photosynthétique, baptisé apicoplaste, dérivant de l'endosymbiose secondaire d'une algue (McFadden, Reith *et al.* 1996).

Des centaines d'espèces de *Plasmodium* ont été décrites, infectant les reptiles, les oiseaux, les rongeurs et les primates. On considérait jusqu'à récemment que quatre espèces de *Plasmodium* sont susceptibles d'infecter l'Homme : *Plasmodium vivax*, *P. malariae, P. ovale* et *P. falciparum*. Depuis, des études menées en Malaisie ont montré que de nombreux cas de paludisme attribués à *P. malariae* sont en réalité causés par *P. knowlesi*, une espèce infectant essentiellement les primates (Singh, Kim Sung *et al.* 2004). C'est *P. falciparum* qui est responsable des formes graves de paludisme, et de la quasi-totalité des décès.

Plasmodium falciparum est un parasite hétéroxène, qui alterne entre deux hôtes au cours de son cycle de développement (Figure 3) : un moustique hématophage du genre *Anopheles*, et l'Homme. Le développement du parasite chez l'Homme est uniquement asexué. Le parasite est injecté à l'Homme lors d'une piqûre par un moustique infecté. Au cours d'une première phase de développement, asymptomatique, le parasite se différencie en trophozoïte et schizonte et se multiplie en mérozoïtes dans les hépatocytes. Puis dans une deuxième phase, les mérozoïtes gagnent le sang périphérique, et pénètrent dans les globules rouges. Chez *P. vivax* et *P. ovale*, il existe des formes hépatiques persistantes susceptibles de réinitialiser un cycle érythrocytaire, entraînant alors une rechute, parfois des années après l'infection initiale.

Au sein du globule rouge, le parasite se transforme et se multiplie : d'abord trophozoïte puis schizonte puis corps en rosace (individualisation des mérozoïtes). Chez l'Homme, la rupture de la cellule hôte intervient, selon l'espèce plasmodiale, 48 ou 72 heures après l'invasion et libère dans la circulation en moyenne 16 nouveaux mérozoïtes qui parasitent d'autres hématies. Ce développement érythrocytaire est responsable des symptômes liés à la maladie : fièvres intermittentes, anémie, atteintes cérébrales… Au stade érythrocytaire, certains parasites se différencient en gamétocytes qui initient la phase de reproduction sexuée lorsqu'ils sont transmis au moustique lors d'un nouveau repas sanguin. Dans le tube digestif

du moustique, les gamétocytes se transforment en gamètes, et la fécondation a lieu. Le zygote, devenu ookinète, est mobile et traverse l'épithélium intestinal pour aller s'enkyster sur la paroi externe sous la forme d'un oocyste. Celui-ci se différencie, subit une réduction chromatique, et, au bout de 7 à 10 jours, l'éclatement de l'oocyste libère des centaines de sporozoïtes haploïdes, qui vont migrer jusque dans les glandes salivaires du moustique, et pourront être injectés à l'Homme.

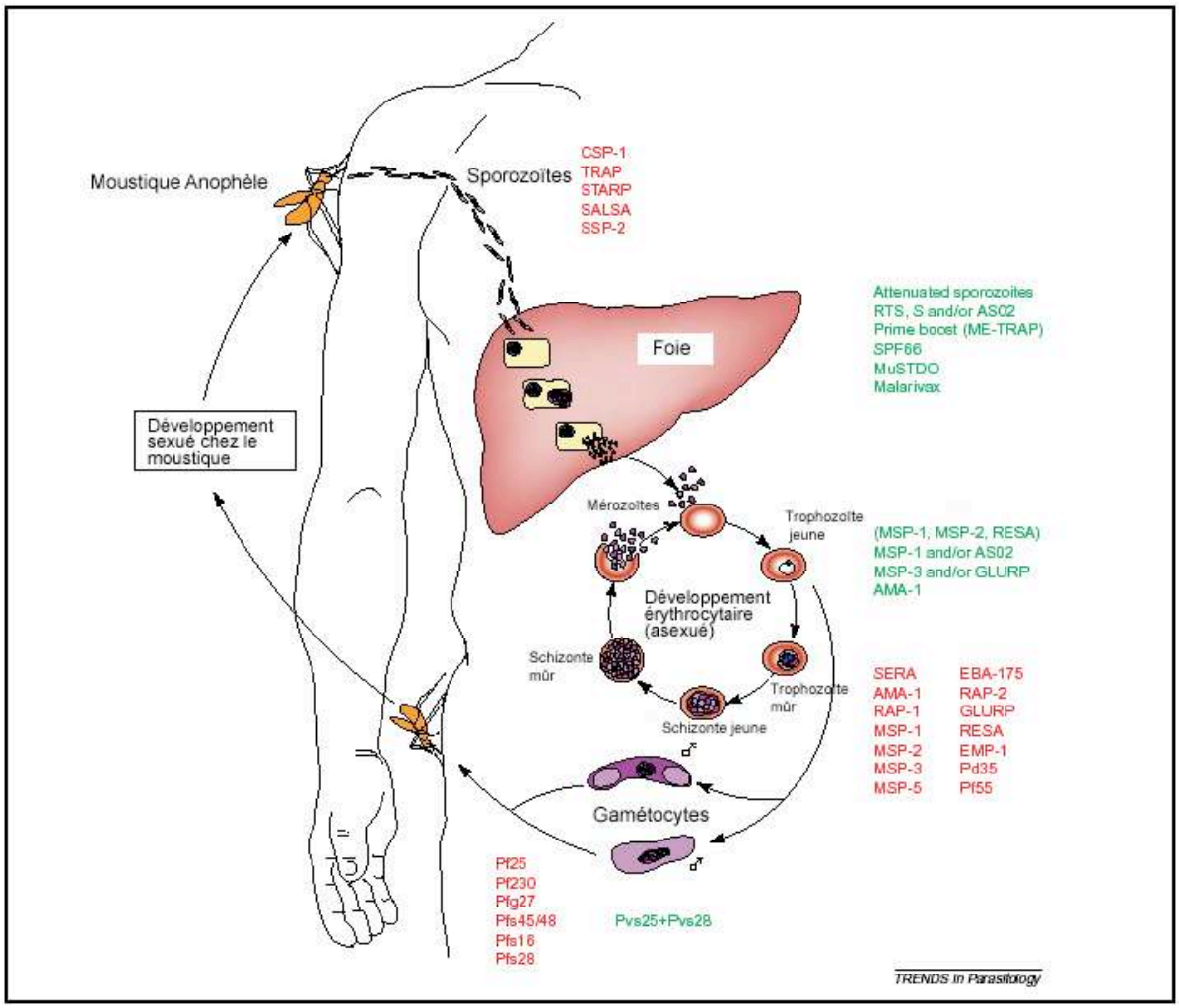


Figure 3 : Cycle de développement de *Plasmodium falciparum*, et liste des antigènes étudiés dans le cadre du développement d'un vaccin antipaludique.
En rouge : antigènes qui ont été ou sont actuellement considérés comme des candidats vaccinaux. En vert : antigènes dont l'efficacité vaccinale a été ou est actuellement évaluée par des essais cliniques. D'après (Tongren, Zavala *et al*. 2004)

3-- Une maladie réémergente

La lutte contre le paludisme a connu de réelles avancées entre 1900 et 1960, grâce à des programmes de contrôle efficaces impliquant essentiellement la lutte contre le moustique vecteur. La zone exposée au risque palustre est passée de 53 à 27 % de la surface des continents depuis le début du XXe siècle (Hay, Guerra *et al.* 2004), et le paludisme a pu être complètement éradiqué dans de nombreuses régions (Figure 1). Dans le courant des années 60 le paludisme semblait même être au bord de l'éradication, comme en témoigne Paul Russel, paludologue, en 1955 : 'While keeping in mind the realities, one can nevertheless be confident that malaria is well on its way towards oblivion'. Malheureusement, la situation est très différente à l'heure actuelle. L'éradication du paludisme dans de nombreuses régions depuis 1900 a essentiellement concerné les zones de faible transmission, alors que dans les régions fortement endémiques, la situation se détériore progressivement (Hay, Guerra *et al.* 2004) : l'incidence du paludisme et la gravité des accès augmentent dans ces régions. En Afrique, la mortalité infantile liée au paludisme a augmenté au cours des dernières années (OMS 2004). En parallèle, la maladie réapparaît dans certaines zones où elle semblait sous contrôle ou même éradiquée. De plus, le développement des transports aériens et des voyages augmente à la fois le nombre de cas de paludisme 'd'aéroport' et chez les voyageurs de retour de zone d'endémie.

La réémergence du paludisme semble essentiellement liée aux problèmes de résistance, qu'il s'agisse de parasites devenus résistants aux principales drogues, ou de moustiques résistants aux principaux insecticides. D'autres facteurs humains sont en cause, par exemple l'expansion urbaine, le déplacement de populations vers des zones d'endémie suite à des conflits, ou encore la mise en place de zones d'irrigation, qui créent de nouvelles niches écologiques pour les moustiques. Toutefois, des phénomènes climatiques, tels le réchauffement climatique ou des événements d'El Nino observés ces dernières décennies ont également contribué à modifier l'aire de répartition du paludisme. En effet, les changements climatiques sont susceptibles de modifier la répartition des sites de reproduction des moustiques, et de ce fait, la répartition géographique de la maladie.

Les organisations internationales sont conscientes de la réémergence préoccupante du paludisme, comme en témoignent les multiples initiatives et programmes spécifiques. En particulier, le programme 'Roll Back Malaria' a été initié en 1998, et associe des pays où le paludisme est endémique, des organisations internationales (OMS, UNICEF, Banque

Mondiale…), des acteurs de la recherche fondamentale, et le secteur privé. L'objectif initial était de diminuer de moitié le nombre de décès liés au paludisme d'ici 2010. Mais en 2004, la mortalité en Afrique a augmenté de 10 % par rapport au chiffre de 1998. L'efficacité de la gestion de ce programme, et surtout les contributions de chacun des partenaires, jugées très insuffisantes, sont sévèrement critiqués (Attaran 2004).

4-- Les stratégies de lutte contre le paludisme

4-1 : Lutte contre le vecteur

L'identification par Sir Ronald Ross à la fin du XIXe siècle du vecteur du paludisme a permis de mettre en place des programmes efficaces d'éradication des anophèles, par un aménagement du territoire spécifique visant à supprimer les mares et pièces d'eau dans lesquelles les larves se développent. De telles opérations ont été menées avec succès entre 1900 et 1945, notamment autour du canal de Panama et dans les régions minières de Zambie. Plus généralement, cette approche a été utilisée dès lors qu'elle semblait réalisable en termes logistiques, mais aussi et surtout dans des régions où la perspective d'investissements de capitaux rendait cet aménagement rentable. La mise au point dans les années 40 du dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) a permis pour la première fois d'envisager une lutte à grande échelle contre les moustiques. L'utilisation massive du DDT préconisée par l'OMS entre 1955 et 1969 a eu un réel impact et a permis de réduire considérablement la zone de répartition du paludisme (Figure 1). Depuis, cette pratique a été abandonnée, suite à la prise de conscience de l'impact nocif des insecticides sur la santé humaine, ainsi que des problèmes écologiques liés à leur utilisation trop systématique. Par ailleurs, l'apparition de moustiques résistants aux principaux insecticides avait déjà réduit l'impact des traitements. À l'heure actuelle, des stratégies de lutte biologique sont envisagées, utilisant des insectes génétiquement modifiés réfractaires au parasite, avec toutes les questions écologiques et éthiques que soulève l'introduction d'animaux transgéniques dans l'environnement (Nirmala and James 2003).

4-2 : Lutte contre le parasite

4-2-1 Les vaccins

Il existe une immunité protectrice relative, ou prémunition contre *Plasmodium falciparum*, qui se développe chez les enfants constamment exposés au paludisme, et qui devient effective

vers l'âge de 15 ans. Cette immunité n'est maintenue que chez les individus régulièrement en contact avec le parasite. Elle n'est pas stérilisante, mais protège contre les manifestations cliniques de la maladie (Struik and Riley 2004). Il est donc difficile d'exploiter la réponse immunitaire de l'hôte pour élaborer un vaccin qui permettrait d'éliminer le parasite de l'organisme.

Depuis plus de 20 ans, de nombreux travaux ont porté sur l'identification d'épitopes protecteurs du parasite, qui pourraient entrer dans la composition d'un vaccin. Mais malgré plusieurs essais prometteurs, aucun vaccin n'est disponible contre le paludisme à ce jour. Différentes stratégies de lutte vaccinale sont envisagées :

Vaccins dirigés contre les stades hépatiques.

Cette approche vise à bloquer le développement du parasite avant même qu'il ne gagne la circulation périphérique, en inhibant soit l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes injectés par le moustique (réponse humorale), soit la libération des mérozoïtes hépatiques, en détruisant les hépatocytes infectés avant leur rupture (réponse cellulaire). Les essais vaccinaux par injection de sporozoïtes irradiés ont commencé il y a plus de 30 ans (Clyde, Most *et al.* 1973) et tous confirment l'efficacité de cette approche. Mais jusqu'à présent les difficultés de production des sporozoïtes ont empêché le développement d'un vaccin à grande échelle. Toutefois, une récente étude de faisabilité indique que, grâce aux avancées technologiques, la production en masse de sporozoïtes devient envisageable (Luke and Hoffman 2003).

Vaccins dirigés contre les stades érythrocytaires. Un tel vaccin permettrait de réduire l'infection, mais surtout la morbidité, dans la mesure où le développement érythrocytaire du parasite est responsable de tous les symptômes liés à la maladie (Mahanty, Saul *et al.* 2003).

Vaccins 'anti-maladie'. Il s'agit de cibler des mécanismes non vitaux pour le parasite, mais qui participent à la morbidité palustre. Il peut s'agir par exemple de diriger la réponse immunitaire contre une toxine (par exemples les ancrages GPI, connus pour induire une réponse inflammatoire) (Schofield, Vivas *et al.* 1993) ou d'inhiber le processus de séquestration placentaire, responsable des complications liées au paludisme gestationnel (Scherf, Pouvelle *et al.* 2001).

Vaccins bloquant la transmission. Ce type de vaccin, dirigé contre les gamétocytes, a pour objectif d'interrompre la transmission du parasite de l'Homme au moustique, mais il n'interfère pas avec le développement du parasite chez l'Homme. Cette approche altruiste est

donc envisagée en association avec d'autres types de vaccins qui protègeraient la personne vaccinée (Carter, Mendis *et al.* 2000).

La figure 3 fait le bilan des antigènes actuellement à l'étude pour développer des candidats vaccins.

4-2-2 Les drogues

Les drogues disponibles sont dirigées contre les formes hépatiques et érythrocytaires du parasite. Le tableau 1 récapitule les différentes familles de drogues existantes, et indique leur cible biologique.

Famille de composés	**Drogue**	**Processus biologique inhibé (ou protéine cible si connue)**
Quinine et dérivés	Quinine	Polymérisation de l'hème en hèmozoïne Décomposition de H_2O_2
	Chloroquine	
	Méfloquine	
Antifoliques	Sulfadoxine	Dihydroptéroate synthase
Antifoliniques	Pyriméthamine	Dihydrofolate réductase
Artémisine et dérivés	Artémisine	Pompe ATPasique à Ca^{2+} (PfATP6)
	Arthémeter	
	Artésunate	
Antibiotiques	Tétracycline	Synthèse de protéines dans l'apicoplaste
	Clindamycine	
	Doxycycline	
Naphtoquinones	Atovaquone	Complexe cytochrome b/c1 (mitochondrie)

Tableau 1 : Différentes familles de drogues et leur cible biologique.

Mais à l'heure actuelle ces drogues montrent leurs limites, et les autorités sanitaires sont de plus en plus confrontées au problème de l'émergence de résistances aux drogues classiquement utilisées. La chloroquine a été la drogue de première intention pendant près de 40 ans ; peu coûteuse et peu nocive, elle était même incorporée au sel de cuisine au Brésil. Les premiers parasites résistants à la chloroquine sont apparus simultanément en Asie du Sud-Est et en Amérique du Sud à la fin des années 60. Ces parasites se sont propagés très rapidement, atteignant l'Afrique dans les années 80, et, de fait, ils sont à présent répandus dans la quasi-totalité des pays impaludés. La résistance à la sulfadoxine et à la pyriméthamine, un traitement alternatif à la chloroquine qui reste accessible aux populations touchées, est déjà largement rencontrée en Asie du Sud-Est et en Amérique du Sud (White,

Nosten *et al.* 1999), et se propage à présent dans les pays Africains (Yeung, Pongtavornpinyo *et al.* 2004). En Asie du Sud-Est, foyer d'émergence de parasites polyrésistants, la méfloquine a remplacé en 1984 les drogues classiques en traitement de première intention, mais les premiers parasites résistants sont apparus après seulement 6 ans d'utilisation et se sont rapidement propagés (Yeung, Pongtavornpinyo *et al.* 2004). C'est ainsi que l'artémisine et ses dérivés, qui sont les drogues les plus récentes, sont à présent utilisées comme traitement de première intention ; les traitements préconisés à l'heure actuelle sont des combinaisons de dérivés d'artémisine et d'autres drogues. Quelques nouvelles drogues sont en cours d'essai clinique, mais aucune n'est actuellement disponible dans l'éventualité où des résistances à l'artémisine apparaîtraient. Ainsi, le développement de nouvelles drogues, qui nécessite la recherche de nouvelles cibles est un enjeu crucial pour les prochaines années.

5-- La nécessité de recherche de nouvelles cibles thérapeutiques

La majorité des antipaludiques actuellement sur le marché ont été découverts empiriquement : ils sont issus de produits de la pharmacopée traditionnelle, dont on a caractérisé et extrait le principe actif (quinine, artémisine). Cette approche a permis de mettre au point des drogues très efficaces. Mais elle présente l'inconvénient majeur que l'on ne connaît pas précisément le mécanisme d'action de la drogue, et sa molécule cible peut être difficile à caractériser. Ainsi, après des décennies d'utilisation massive, les processus ciblés par la chloroquine étaient toujours étudiés en 1992 (Slater and Cerami 1992). Il est difficile dans ce cas d'établir avec précision le schéma d'utilisation optimal de la drogue (seule ou en combinaison, par exemple) pour limiter l'apparition de résistances ou d'effets secondaires.

La publication de la séquence complète du génome de *P. falciparum* a marqué le début de l'ère de la génomique et de la protéomique, et ces travaux ouvrent de nouvelles perspectives pour une meilleure connaissance de la biologie du parasite, et pour la définition de nouvelles cibles thérapeutiques. Plusieurs analyses génomiques ont permis d'établir le profil d'expression des gènes tout au long du cycle érythrocytaire, ainsi qu'aux stades sporozoïtes et gamétocytes (Ben Mamoun, Gluzman *et al.* 2001; Bozdech, Llinas *et al.* 2003; Le Roch, Zhou *et al.* 2003). En parallèle, des études protéomiques à grande échelle (Florens, Washburn *et al.* 2002; Lasonder, Ishihama *et al.* 2002) permettent d'identifier des protéines synthétisées à différents stades de développement du parasite. Les résultats de ces études sont très prometteurs pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques ou vaccinales. Mais de

telles approches produisent tellement de données que leur analyse équivaut parfois à chercher une aiguille dans une botte de foin… Les approches plus classiques consistant à étudier des mécanismes clé pour le parasite ne sont donc pas tombées en désuétude. Il s'agit d'étudier des mécanismes essentiels au développement parasitaire, dont on pense qu'ils sont spécifiques au parasite, afin de mieux caractériser les acteurs moléculaires impliqués. Ces molécules, qui constituent des cibles thérapeutiques potentielles, peuvent alors faire l'objet d'une recherche d'inhibiteurs spécifiques. Cette étape est facilitée par la possibilité de cribler de façon automatisée des banques de composés issus de la chimie combinatoire. Une telle approche a été suivie avec succès par l'équipe d'Henri Vial (Université Montpellier 2), qui a caractérisé les voies de métabolisme des phospholipides chez *P. falciparum* et montré que ce métabolisme est indispensable (H. Vial 1998) et spécifique au parasite (L. L. M. van Deenen 1975). Des inhibiteurs de la voie de synthèse de la phosphatidylcholine ont été développés en partenariat avec le secteur privé. L'un d'eux, le composé G25, s'est avéré très efficace et peu toxique (Wengelnik, Vidal *et al.* 2002). Il inhibe en effet la croissance *in vitro* de *P. falciparum* et *P. vivax*, et la concentration de G25 nécessaire pour obtenir 50 % d'inhibition de la croissance du parasite varie de 1 à 5 nM selon les souches traitées. L'action de cet inhibiteur s'exerce spécifiquement sur le parasite : le composé est en effet 1000 fois moins toxique sur des cellules de Mammifères, et, de plus, il s'accumule préférentiellement dans les érythrocytes parasités. Les premiers essais réalisés *in vivo* ont montré que de très faibles doses du composé G25 suffisent à guérir des singes infectés par *P. falciparum* et *P. cynomolgi* (Wengelnik, Vidal *et al*. 2002).

Il est essentiel pour la réussite d'une telle entreprise que les mécanismes ciblés par la drogue ne soient pas conservés chez l'hôte, ou sinon que la drogue exerce une toxicité accrue vis-à-vis du parasite, faute de quoi les effets secondaires de la drogue risquent de rendre celle-ci inutilisable. À ce titre, l'étude de mécanismes susceptibles de ne pas être conservés chez l'hôte s'avère très intéressante. Nous allons à présent expliquer les raisons pour lesquelles, dans cette optique, nous nous sommes intéressés à l'étude du processus de transport des protéines plasmodiales depuis le parasite vers la membrane du globule rouge.

6-- L'intérêt d'étudier le transport des protéines plasmodiales

Au cours de son développement intra-érythrocytaire, *P. falciparum* induit d'importantes modifications des propriétés physico-chimiques et de l'architecture ultrastructurale de sa

cellule hôte. En effet, l'hématie est une cellule différenciée entièrement dépourvue d'organites et de membranes internes, et la survie du parasite dans cet environnement repose sur la mise en place par celui-ci d'un système d'échange avec sa cellule hôte et le milieu extérieur. La mise en place de ce système d'interaction avec le milieu extérieur requiert le transport de protéines parasitaires dans le cytoplasme et la membrane plasmique de l'érythrocyte.
Les changements du globule rouge induits par le développement de *P. falciparum* peuvent être regroupés en quatre catégories :

Le parasite induit des modifications ultrastructurales importantes de sa cellule hôte : lors du développement du parasite, plusieurs compartiments membranaires se forment dans le cytoplasme du globule rouge, ce qui nécessite l'export de lipides et de protéines hors du parasite (Langreth, Jensen *et al.* 1978). Le premier compartiment membranaire mis en place au sein de l'érythrocyte est la vacuole parasitophore, qui est formée lors de l'invasion de l'érythrocyte par le mérozoïte. La membrane de la vacuole parasitophore sépare le parasite du cytoplasme du globule rouge ; les protéines et les lipides qui composent cette membrane sont d'origine mixte, à la fois parasitaire et érythrocytaire. Nous aurons l'occasion de revenir sur l'origine et la description de ces compartiments lors de l'étude du transport des protéines parasitaires dans le cytoplasme du globule rouge.

La perméabilité de l'érythrocyte à de petites molécules (sucres, acides aminés, nucléosides, anions, cations) augmente fortement dès 6 heures après l'invasion (pour revue (Kirk 2001)). La nature précise et l'origine du/des transporteur(s) impliqué(s) sont toujours controversées, mais il semble que toutes ces substances franchissent la membrane du globule rouge par un unique canal à Chlorure (Kirk, Horner *et al.* 1994; Desai, Bezrukov *et al.* 2000; Egee, Lapaix *et al.* 2002). La plupart des études suggèrent en fait que ce canal est endogène de la membrane plasmique du globule rouge, et qu'il est activé par le parasite lui-même selon divers mécanismes : phosphorylations, stress oxydatif ou mécanique (Huber, Uhlemann *et al.* 2002).

La fluidité membranaire d'un globule rouge parasité par *P. falciparum* diminue. Ce phénomène s'explique essentiellement par l'export de protéines parasitaires à la membrane du globule rouge (Glenister, Coppel *et al.* 2002) qui déstabilisent la membrane, mais aussi par le stress oxydatif lié à l'infection qui entraîne le dépôt de molécules d'hémoglobine oxydée sur la face interne de la membrane du globule rouge (Giribaldi, Ulliers *et al.* 2001).

Les globules rouges parasités par *P. falciparum* acquièrent en outre la capacité de se lier aux cellules endothéliales. Ce sont les knobs, des protubérances de protéines parasitaires

enchâssées dans la membrane du globule rouge, qui interagissent avec les récepteurs des cellules endothéliales (Crabb, Cooke *et al.* 1997). Les knobs sont formés de l'assemblage de plusieurs protéines, dont nous allons être amenés à reparler. Il s'agit en particulier de la protéine PfEMP1, (*Erythrocyte Membrane Protein 1*), une protéine transmembranaire de la membrane érythrocytaire spécifiée par les gènes de la famille multigénique *Var*, qui est associée à HRPI (*Histidine Rich Protein I*), et PfEMP3, des protéines solubles dans le cytoplasme du globule rouge, qui sont recrutées sous la membrane plasmique au niveau des knobs. Cette propriété de cytoadhérence a de fortes implications en termes de physiopathologie, dans la mesure où l'adhérence des globules rouges parasités aux cellules endothéliales dans le cerveau est impliquée dans la genèse du paludisme cérébral (MacPherson, Warrell *et al.* 1985).

Ainsi, l'export de protéines parasitaires vers le cytoplasme et la membrane du globule rouge semble essentiel à l'établissement des modifications du globule rouge par le parasite et au développement de celui-ci. Cette machinerie de transport et de tri des protéines est mise en place dans une cellule entièrement dépourvue d'un système de transport interne, et est donc de toute évidence d'origine parasitaire. Elle conduit à l'export de protéines au-delà de la membrane plasmique du parasite, dans le cytoplasme de sa cellule hôte. Ces constatations soulèvent plusieurs questions : Quels sont les mécanismes de transport des protéines à travers la vacuole parasitophore, au sein du cytoplasme du globule rouge, et permettant l'ancrage des protéines dans la membrane du globule rouge ? Quels signaux adressent les protéines à ces différentes destinations extracellulaires ? Ce transport extracellulaire utilise-t-il des mécanismes moléculaires conservés, ou au contraire des molécules nouvelles, adaptées au développement dans une cellule aussi particulière que l'érythrocyte ?

Le transport des protéines de *P. falciparum* peut être séparé en deux problématiques, que nous allons traiter séparément : le transport intracellulaire des protéines au sein du parasite, et le transport des protéines au-delà de la membrane du parasite, vers la vacuole parasitophore, le cytoplasme ou la membrane du globule rouge.

II- Le transport intracellulaire des protéines chez *P. falciparum*

Le transport des protéines au sein du parasite met en jeu des acteurs du reticulum endoplasmique (RE) et de l'appareil de Golgi. Nous allons montrer que la plupart des éléments de la voie classique du système de sécrétion eucaryote sont conservés chez les stades érythrocytaires de *P. falciparum*.

1-- Le Reticulum Endoplasmique, première étape de tri des protéines sécrétées

La grande majorité des protéines adressées vers un compartiment subcellulaire ou sécrétées hors de la cellule sont transférées de façon co-traductionnelle dans le RE, qui constitue la première étape de tri des protéines non cytoplasmiques. Ce processus de tri et d'adressage des protéines s'achève dans l'appareil de Golgi. Diverses études de microscopie électronique montrent que le RE de *P. falciparum* a une morphologie similaire à celui des cellules eucaryotes (Atkinson and Aikawa 1990), et qu'il forme, dès le stade anneau, un réseau en continuité avec l'enveloppe nucléaire du parasite (Bannister, Hopkins *et al.* 2004). Plusieurs marqueurs protéiques du RE ont été identifiés, ce qui suggère que les fonctions biologiques classiques du RE sont conservées chez *P. falciparum*.

1-1 Transport des protéines de sécrétion à travers la membrane du RE

1-1-1 Caractéristiques du peptide signal

Chez les Eucaryotes, les protéines sécrétées portent un peptide signal qui entraîne le ribosome vers la membrane du RE et amorce le transfert de la protéine en cours d'élongation à travers cette membrane. Classiquement, le peptide signal est une séquence longue de 16 à 30 résidus, comportant un noyau de 7 à 15 acides aminés hydrophobes situés 3 à 17 résidus en aval du début de la chaîne peptidique (von Heijne 1985). Chez *P. falciparum*, certaines protéines sécrétées sont pourvues d'une séquence signal typique, similaire à ce que l'on observe chez les eucaryotes supérieurs (Nacer, Berry *et al.* 2001), alors que d'autres possèdent un peptide signal dit interne, dont le noyau hydrophobe est situé 50 à 80 résidus en aval du début de la chaîne peptidique (Lingelbach 1993; Foley and Tilley 1998). De tels peptides signal sont rares chez les eucaryotes supérieurs, mais quelques cas similaires ont été décrits, en particulier celui de l'ovalbumine (Tabe, Krieg *et al.* 1984). Ces séquences signal internes ne sont pas en

général accolées à un domaine transmembranaire, et ne doivent donc pas être confondues avec les séquences signal topogènes, courantes chez les eucaryotes, qui interviennent dans l'ancrage des domaines transmembranaires dans le RE et l'acquisition par la protéine d'une topologie adéquate. Enfin, certaines protéines de *P. falciparum* sont sécrétées alors qu'elles sont dépourvues de séquence signal (notamment PfSBP1). Le transport de protéines dépourvues de peptide signal à travers la membrane du RE ayant été décrit chez d'autres organismes (Martoglio and Dobberstein 1998), il n'est pas exclu que les protéines plasmodiales dépourvues de séquence signal soient sécrétées par la voie classique du RE et de l'appareil de Golgi.

1-1-2 La particule de reconnaissance du signal et le franchissement de la membrane du RE

La particule de reconnaissance du signal, formée de 6 polypeptides et d'un ARN de 300 nucléotides se fixe au peptide signal et amorce l'arrimage du ribosome et de la chaîne protéique naissante à la membrane du RE. Des études de traduction *in vitro* ont montré que la particule de reconnaissance du signal des Eucaryotes interagit avec les séquences signal classiques de *P. falciparum*, et induit le transport co-traductionnel des protéines dans des microsomes de mammifères (Ragge, Arnold *et al.* 1990; Gunther, Tummler *et al.* 1991). De nombreux gènes spécifiant des protéines homologues à la particule de reconnaissance du signal ont été identifiés au sein du génome de *P. falciparum*, sans que l'on sache pour autant s'ils sont traduits en protéines fonctionnelles. Lorsque le ribosome est lié à la membrane du RE, le polypeptide traverse cette membrane à travers des pores protéiques, formés de l'assemblage de 3 protéines de la famille sec61 (Sec61α, β, γ). Un homologue de la protéine sec61α a été identifié et caractérisé chez *P. falciparum* (Couffin, Hernandez-Rivas *et al.* 1998), suggérant que le mécanisme de translocation des protéines à travers la membrane du RE est conservé. Dès qu'une protéine émerge dans la lumière du RE, elle se lie à la protéine BiP (*heavy chain binding protein*), qui empêche le repliement ou l'agrégation de protéines en se liant aux domaines hydrophobes par lesquelles elles auraient tendance à interagir. Elle pourrait également participer à la translocation de certaines protéines dans la lumière du RE. Un homologue de BiP a été identifié et caractérisé chez *P. falciparum* (Kumar and Zheng 1992).

1-1-3 Clivage du peptide signal

Une fois les protéines orientées dans la lumière du RE, leur séquence signal est clivée par une endoprotéase spécifique, appelée signalpeptidase. Des études ont montré que le peptide signal de certaines protéines plasmodiales, notamment de la protéine PfExp1 (Kara, Murray *et al.* 1990), est effectivement clivé, ce qui suggère que le parasite possède une activité signalpeptidase. Des études bio-informatiques ont identifié plusieurs gènes spécifiant des protéines homologues à des signalpeptidases (Wu, Wang *et al.* 2003) au sein du génome de *P. falciparum*, mais leur activité n'a pas été caractérisée. Les séquences signal internes possèdent souvent des sites de clivage, mais on ignore si celles-ci sont clivées (Cooke, Lingelbach *et al.* 2004).

1-1-4 Topologie des protéines trans-membranaires

Le processus selon lequel les protéines trans-membranaires s'insèrent dans les membranes biologiques avec la topologie adéquate est relativement bien connu chez les Eucaryotes. Les protéines membranaires acquièrent leur topologie de façon co-traductionnelle, à l'occasion de leur transfert dans le RE. Ce processus met en jeu diverses séquences dites topogènes. Par exemple, certaines séquences peptidiques bloquent le transfert dans le RE de la protéine en cours d'élongation, et deviendront le domaine trans-membranaire de la protéine, dont le domaine amino-terminal sera alors orienté dans la lumière du RE. D'autres séquences peuvent aussi agir comme des séquences signal internes, non clivées, qui amorcent le transfert de la chaîne peptidique dans le RE au cours de sa synthèse. L'orientation du domaine transféré dans la lumière du RE dépend alors de la nature et de la charge des résidus hydrophiles entourant la séquence signal interne : le segment portant un excès de charges positives reste du côté cytosolique de la membrane.

Ce processus est conservé chez les Eucaryotes, et nous n'avons pas de raison de penser que ce n'est pas le cas chez *P. falciparum*. Néanmoins, au cours de nos travaux, nous avons été amenés à nous interroger sur les mécanismes topogènes, et nous y reviendrons au chapitre 3.

1-2 Modifications post-traductionnelles des protéines dans le RE

La plupart des protéines sécrétées ou trans-membranaires subissent un certain nombre de modifications post-traductionnelles avant leur sortie de l'appareil de Golgi. Les principales modifications post-traductionnelles sont la formation de ponts disulfure, le reploiement correct de la chaîne polypeptidique, la glycosylation, et des clivages protéolytiques. Seules les deux premières modifications citées ont lieu exclusivement dans le RE.

1-2-1 Formation de ponts disulfure

Les ponts disulfure, qui associent deux résidus cystéines sont l'une des principales forces stabilisant la structure tertiaire des protéines. La protéine homologue de l'enzyme catalysant la formation des ponts disulfure, la Protéine Disulfide Isomérase (PDI) a été caractérisée récemment chez *P. falciparum* (Florent, Mouray *et al.* 2000). Elle est en majorité localisée dans le RE du parasite, mais une fraction semble être exportée dans des structures membranaires du cytoplasme du globule rouge (Philippe Grellier, communication personnelle).

1-2-2 Reploiement correct des chaînes peptidiques

Le RE contient plusieurs chaperons moléculaires, dont les protéines PDI et BiP, qui participent à l'acquisition par les protéines d'une structure tridimensionnelle adéquate. Nous avons déjà mentionné l'existence de protéines homologues à ces chaperons chez *P. falciparum*. Citons également le rôle de la peptidylprolyl isomérase, une enzyme qui accélère la rotation des groupements chimiques autour de l'axe de la liaison peptidique ; plusieurs gènes spécifiant des protéines homologues putatives ont été annotés dans le génome de *P. falciparum* (PF08_0121, PF11_0164, PFI1490c, PFL0120c, PFL0735w, PFL2275c et MAL13P1.68). Néanmoins, on ignore si l'activité enzymatique des produits de ces gènes est conservée.

1-3 La sortie des protéines hors du RE

1-3-1 Quelles protéines quittent le RE ?

Il existe un système de contrôle de qualité à la sortie du RE, qui assure que seules les protéines correctement repliées sont effectivement transportées vers l'appareil de Golgi. Les autres sont reconnues par des protéines chaperon, notamment BiP ; une protéine liée à un chaperon est retenue dans le RE et finit par être dégradée si elle n'acquiert pas une conformation correcte. Selon les types cellulaires, on considère que de 30 à 75 % des protéines sont dégradées moins de 20 minutes après leur synthèse : le contrôle de qualité est donc essentiel au maintien des fonctions cellulaires (Ellgaard and Helenius 2003).

Les protéines résidentes du RE –dont les protéines chaperon mentionnées précédemment- ne doivent pas non plus être exportées dans l'appareil de Golgi. Un récepteur spécifique de ces protéines, ERD2, est localisé dans la membrane des vésicules du cis-Golgi ; il reconnaît le motif peptidique de rétention des protéines dans le RE et permet ensuite le recyclage des

protéines solubles du RE par le biais d'un transport vésiculaire rétrograde. Chez les eucaryotes la séquence consensus du motif peptidique de rétention dans le RE est KDEL ; celle-ci est conservée chez *P. falciparum*, où les protéines résidentes du RE possèdent le motif peptidique XDEL, X étant généralement un résidu isoleucine ou histidine (La Greca, Hibbs *et al.* 1997). Par ailleurs, une protéine homologue de ERD2, PfERD2 a été identifiée chez *P. falciparum,* et elle est localisée dans l'appareil de Golgi du parasite (Elmendorf and Haldar 1993).

1-3-2 Le transport vésiculaire entre le RE et l'appareil de Golgi

Le transport de protéines entre le RE et l'appareil de Golgi met en jeu des vésicules membranaires qui émergent à la surface du RE et fusionnent avec la membrane du cis-Golgi. Si le processus de formation des vésicules à la surface d'une membrane peut s'opérer de différentes manières, en revanche la fusion d'une vésicule et d'une membrane se fait selon un mécanisme conservé quelles que soient les membranes impliquées dans la fusion.

Le transport vésiculaire entre le RE et l'appareil de Golgi utilise des vésicules recouvertes de protéines de la famille COPII (*Coat Protein Complex II*), dont l'assemblage peut être reconstitué à partir de 5 protéines : Sar1p, Sec13-Sec31p, et Sec23-Sec24p (Figure 4). Des protéines homologues à Sar1p, Sec31 et Sec23 ont été caractérisées chez *P. falciparum,* ce qui suggère que ce processus est conservé chez le parasite (Albano, Berman *et al.* 1999; Adisa, Albano *et al.* 2001; Wickert, Rohrbach *et al.* 2003). La petite protéine G Sar1p est cytosolique sous sa forme liée au GDP, mais elle est recrutée à la membrane du RE en interagissant avec Sec12, protéine transmembranaire du RE, qui sert de donneur de GTP. Sous sa forme liée au GTP, Sar1p interagit d'une part avec le domaine cytosolique des protéines cargo transmembranaires et recrute d'autre part le complexe Sec23p-Sec24p. Ce dernier recrute ensuite le complexe Sec13-Sec31p, qui entraîne une déformation de la membrane du RE, et induit la formation d'une vésicule. Une fois la vésicule formée, la protéine Sar1p échange son GTP sous l'effet de l'activité GTPase de Sec23p, et le complexe des COPII se dissocie (Barlowe 2002). Les signaux d'incorporation dans les vésicules des protéines cargo transmembranaires sont connus : il s'agit en général d'une paire d'acides aminés hydrophobes située dans leur queue cytoplasmique, qui est reconnue par la protéine Sec24p. Celle-ci existe sous différentes formes, qui reconnaissent chacune des types de protéines cargo différentes (Barlowe 2003). En revanche les signaux d'export des protéines solubles sont moins bien caractérisés ; dans la mesure où les protéines sécrétées ne sont pas particulièrement

concentrées à la sortie du RE, il est probable que leur transport n'est pas très sélectif, et que leur tri vers des voies de transport spécifiques se fait au sein de l'appareil de Golgi.

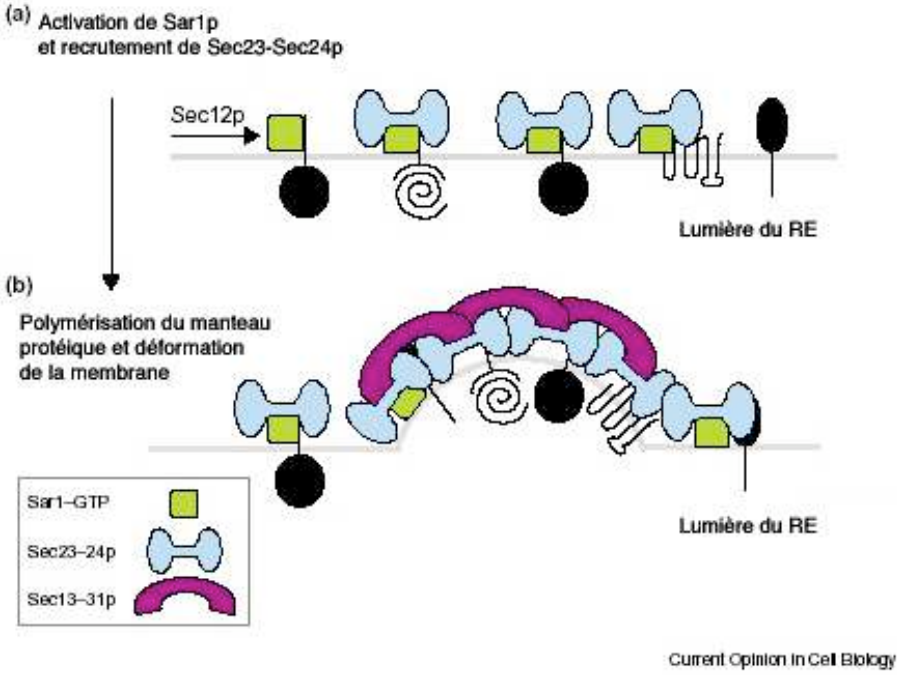


Figure 4 : Formation d'une vésicule enrobée de protéines de la famille COPII à la surface du RE.
(a) La protéine Sar1p est recrutée et activée par son interaction avec Sec12p, qui sert de donneur de GTP. Elle interagit avec le domaine cytosolique des protéines cargo, et recrute le complexe Sec23p-Sec24p. (b) Le complexe Sec23p-Sec24p recrute ensuite le complexe Sec13-Sec31, ce qui entraîne une déformation de la membrane du RE, et la formation d'une vésicule. D'après (Barlowe 2002).

2-- L'appareil de Golgi de *P. falciparum*

La question de l'existence d'un appareil de Golgi chez *P. falciparum* est restée en suspens pendant longtemps, du fait de l'absence d'un appareil de Golgi caractéristique au stade trophozoïte. Certains auteurs ont même mis en cause son existence (Banting, Benting *et al.* 1995), en se fondant sur des travaux menés chez *Giardia Lamblia*, un autre parasite protozoaire, chez qui l'on ne détecte un appareil de Golgi qu'à certains stades de développement. Toutefois, depuis quelques années, des arguments s'accumulent et plaident en faveur de l'existence d'un appareil de Golgi chez *P. falciparum*, qui a une morphologie atypique, mais remplit les fonctions d'un appareil de Golgi classique. De plus, comme nous le verrons par la suite, de plus en plus de données laissent à penser que le parasite exporte un

appareil de Golgi dans le cytoplasme de sa cellule hôte. Nous allons dans un premier temps nous limiter à l'étude des structures apparentées à un appareil de Golgi localisées dans le cytoplasme du parasite ; le cas des structures golgiennes exportées par le parasite dans le cytoplasme de sa cellule hôte sera traité en détail dans un second temps.

2-1 Caractérisation de l'appareil de Golgi de *P. falciparum*

2-1-1 Organisation structurale de l'appareil de Golgi de *P. falciparum*

Diverses études de microscopie électronique ont permis l'observation de structures apparentées à un appareil de Golgi (Slomianny and Prensier 1990; Trelka, Schneider *et al.* 2000) : les auteurs ont observé des vésicules enrobées dont l'aspect est similaire à celui des vésicules golgiennes classiques. Mais la ressemblance morphologique s'arrête là : l'appareil de Golgi de *P. falciparum* est dispersé dans le cytoplasme du parasite, et le cis et le trans-Golgi sont physiquement séparés (Van Wye, Ghori *et al.* 1996), alors que ces différents domaines sont généralement empilés les uns sur les autres. De plus, l'appareil de Golgi de *P. falciparum* est totalement dépourvu de structures en citernes. Ceci vient peut-être du fait que chez *P. falciparum* les enzymes de glycosylation (glycosyltransférases et glycosylases) sont très peu abondantes, alors que c'est l'assemblage de ces protéines transmembranaires en complexes qui est à l'origine de la formation des citernes (Nilsson, Hoe *et al.* 1994). L'organisation originale de l'appareil de Golgi de *P. falciparum* pourrait également être liée à des interactions entre certaines protéines du RE et des protéines cytoplasmiques. En effet, l'analyse de la séquence peptidique de PfERD2 montre la présence d'un motif peptidique particulier de 4 acides aminés dans son domaine cytoplasmique, par lequel elle serait susceptible d'interagir avec des protéines cytoplasmiques, ce qui pourrait modifier l'organisation générale de l'appareil de Golgi (Elmendorf and Haldar 1993; Haldar 1998). Toutefois, au stade mérozoïte, l'appareil de Golgi de *P. falciparum* acquiert une organisation plus classique, avec des vésicules empilées (Ward, Tilney *et al.* 1997).

Par ailleurs, chez les mammifères, on distingue l'appareil de Golgi cis-median-trans du TGN, ou Trans-Golgi-Network. Le TGN est un réseau tubulaire réticulé d'où émergent des vésicules de transport, qui diffère du trans-Golgi par sa morphologie et par certaines activités enzymatiques. En raison de l'originalité de l'organisation de l'appareil de Golgi de *P. falciparum*, cette distinction n'est pas utilisée.

2-1-2 Caractérisation biochimique de l'appareil de Golgi de *P. falciparum*

Diverses protéines marqueurs de l'appareil de Golgi ont été caractérisées chez *P. falciparum* : celles-ci sont récapitulées dans le tableau 2.

Protéine	Localisation subcellulaire (dans les cellules de mammifères)	Références
PfERD2	Cis-Golgi	(Elmendorf and Haldar 1993)
Sphingomyéline synthase	Golgi	(Elmendorf and Haldar 1993)
PfRab1b	Cis-Golgi	(Quevillon, Spielmann *et al.* 2003)
PfRab4	Trans-Golgi	(Jambou, Zahraoui *et al.* 1996)
PfRab5a	Trans-Golgi	(Gardner, Tettelin *et al.* 1998)
PfRab6	Médian et trans-Golgi	(de Castro, Ward *et al.* 1996)
PfRab11	Trans-Golgi	(Langsley and Chakrabarti 1996)

Tableau 2 : Marqueurs protéiques de l'appareil de Golgi identifiés et caractérisés chez *P. falciparum*.

De plus, des gènes spécifiant des protéines homologues à des protéines golgiennes ont été annotés dans le génome de *P. falciparum*. Ainsi, bien que le cytoplasme du parasite soit dénué d'un appareil de Golgi typique formé d'un empilement de vésicules organisées en citernes, l'identification d'un certain nombre de protéines marqueurs de ce compartiment suggère que la fonction golgienne est conservée chez *P. falciparum*. Elle serait exercée par des compartiments membranaires atypiques, localisés dans le cytoplasme du parasite. La conservation des fonctions biologiques semble ici plus importante que la conservation de l'organisation structurale.

2-2 Le fonctionnement de l'appareil de Golgi de *P. falciparum*

2-2-1 La glycosylation des protéines s'achève dans l'appareil de Golgi

La forme de glycosylation la plus répandue chez *P. falciparum* est l'ajout d'un ancrage glycosylphosphatidylinositol (GPI), qui constitue plus de 90 % des glycosylations. Les N-glycosylations, très limitées, concernent 5 à 10 % des glycosylations, et les O-glycosylations sont soit absentes soit très rares (Gowda, Gupta *et al.* 1997).

2-2-1-1 Les ancrages GPI

L'ajout d'un ancrage GPI est une modification post-traductionnelle particulièrement fréquente chez les Protozoaires (Ferguson 1999), qui permet l'insertion de protéines dans les

membranes. La structure de base est formée d'un groupement éthanolamine phosphate hydrophile, lié par une liaison amide à l'extrémité carboxy-terminale de la protéine, et d'un noyau glycane substitué par des chaînes d'acides gras saturés. L'ancre GPI est présente dans l'appareil de Golgi sous la forme d'un précurseur qui est ajouté en bloc sur la protéine. Chez *P. falciparum*, l'organisation de l'ancre glycolipidique présente quelques particularités : un résidu mannose supplémentaire est lié au groupement mannosyl (en gras dans la figure 5), et un acide myristique est branché sur le groupement inositol. Le diacylglycérol est essentiellement substitué par des molécules d'acide palmitique.

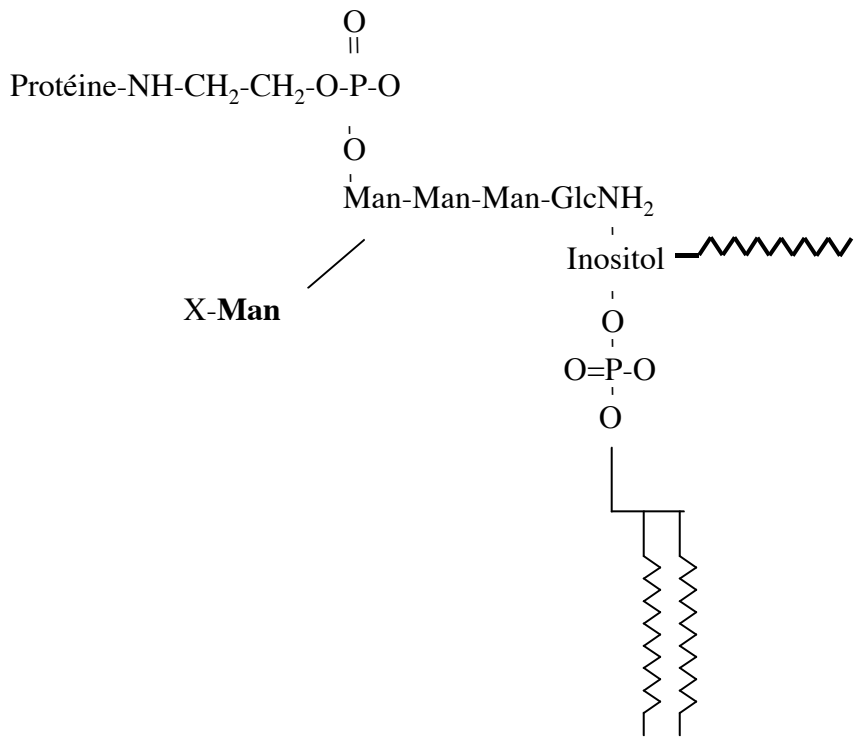


Figure 5 : Organisation de l'ancre GPI chez *P. falciparum* .
X représente un composé non caractérisé. D'après (Gowda and Davidson 1999).

Plusieurs protéines de *P. falciparum* impliquées dans l'invasion des mérozoïtes, en particulier MSP-1 et Pfgp76, possèdent un ancrage GPI. Des expériences de marquage métabolique avec des précurseurs de phosphatidylinositol ont montré que plusieurs autres protéines parasitaires possèdent un ancrage GPI (Braun Breton, Rosenberry *et al.* 1990; Gowda and Davidson 1999). Ces ancres GPI semblent jouer un rôle dans la pathogenèse du paludisme en

déclenchant des réponses pro-inflammatoires (Schofield, Vivas *et al.* 1993), par le biais de récepteurs de la famille *Toll-like* (Krishnegowda, Hajjar *et al.* 2004), de Protéines Kinases C et de Protéines Tyrosine Kinases (Schofield, Novakovic *et al.* 1996; Tachado, Gerold *et al.* 1996). D'autre part, parce qu'ils peuvent conférer l'adressage des protéines vers les *lipid rafts*, des domaines membranaires particuliers enrichis en cholestérol et en sphingolipides, les ancrages GPI participent au transport et au tri de protéines. Nous aurons l'occasion de revenir sur l'organisation et la fonction des *lipid rafts*.

2-2-1-2 Les N-glycosylations

La très faible proportion de N-glycosylations chez *P. falciparum* semble davantage liée à l'absence d'enzymes de cette voie métabolique qu'au manque de sites de glycosylation sur les protéines plasmodiales. En effet, de nombreux sites de glycosylation sont prédits dans la séquence de la protéine MSP-1, ils sont fonctionnels dans des systèmes d'expression hétérologues (Yang, Nikodem *et al.* 1999), mais ne sont pas utilisés chez *P. falciparum* (Holder 1988). Parallèlement, aucune activité oligosaccharyl-transférase n'est détectée dans un lysat de globules rouges parasités par *P. falciparum* (Dieckmann-Schuppert, Bender *et al.* 1992). Il est intéressant de constater que des gènes spécifiant des protéines homologues à certaines enzymes de la voie de glycosylation (N-acétylglucosamine transférase et oligosaccharyl-transférase) ont été annotés dans le génome de *P. falciparum*. Les analyses du transcriptome de *P. falciparum* ont montré que certains d'entre eux sont transcrits aux stades érythrocytaires (PF11_0173, oligosaccharyl-transférase putative), et d'autres pas (PFC0935c, N-acetylglucosamine-1-phosphate transférase, putative)(Le Roch, Zhou *et al.* 2003). Il est possible que la fonction de ces enzymes ne soit pas conservée, ou que leur activité soit très faible. Cela suggère néanmoins que la fonction de glycosylation a été présente chez *Plasmodium*, et a pu être perdue par la suite.

2-2-2 Le tri des protéines, au niveau du trans-Golgi

L'appareil de Golgi constitue un centre de tri majeur pour les protéines sécrétées. En effet, depuis le trans-Golgi, les protéines peuvent être adressées notamment à la membrane plasmique -apicale ou basale si la cellule est polarisée-, vers la voie des endosomes, vers les granules de sécrétion, vers la voie de transport rétrograde, ou encore vers l'apicoplaste.

En référence à ce qui a été décrit pour les cellules polarisés, les auteurs établissent une distinction entre le transport basolatéral et le transport apical, et ce quel que soit le type cellulaire décrit. En effet, il a été montré que dans une cellule polarisée, les protéines sont

adressées à la membrane apicale et à la membrane basolatérale selon des voies de transport différentes, qui coexistent aussi dans les cellules non polarisées (Mellman, Yamamoto *et al.* 1993). Par exemple, chez un fibroblaste au repos la voie basolatérale adresse les protéines sans distinction à toute la surface de la cellule, alors que si la cellule est en train de migrer ces protéines seront spécifiquement transportées vers la région de la cellule qui forme le front de migration (Bretscher 1996).

Chez *P. falciparum* la distinction entre ces deux voies d'adressage n'a pas encore fait l'objet d'études spécifiques, et le mécanisme de la sortie des protéines hors de l'appareil de Golgi reste encore méconnu.

2-2-2-1 Adressage selon la voie du transport basolatéral

Les protéines sont intégrées à la voie du transport basolatéral par le biais de leurs déterminants cytoplasmiques. Ceux-ci présentent une certaine variabilité, mais peuvent être répartis en deux catégories principales : les motifs contenant un résidu tyrosine placé dans un contexte d'au moins un résidu hydrophobe, et ceux formés d'une paire de résidus leucine/leucine ou leucine/isoleucine (pour revue (Keller and Simons 1997), ou (van Vliet, Thomas *et al.* 2003)). Des études de microscopie sur des cellules de mammifères (Keller, Toomre *et al.* 2001) ont montré que le trans-Golgi est organisé en domaines spécialisés dans le transport basolatéral ou apical. Cette subdivision pourrait être liée soit à la répartition non uniforme de certaines protéines coat (Ladinsky, Kremer *et al.* 1994; Dell'Angelica, Mullins *et al.* 1999), soit à une ségrégation latérale des protéines cargo au sein du trans-Golgi. La machinerie de tri et de transport vésiculaire à la sortie de l'appareil de Golgi reste globalement mal connue, même si certains acteurs commencent à être mieux caractérisés. Ainsi il a été montré qu'une sous-unité de la protéine AP-2, protéine adaptatrice des clathrines, interagit avec les motifs contenant des résidus tyrosine (Folsch, Ohno *et al.* 1999), et que les motifs formés d'une paire de leucines interagissent avec une sous-unité de la protéine AP-1 (Rapoport, Chen *et al.* 1998). Ceci suggère que certaines vésicules de transport de l'appareil de Golgi vers la membrane basolatérale sont enrobées de clathrine, même si cela n'a pas été formellement montré (Folsch, Ohno *et al.* 1999). D'autres protéines homologues à des protéines coat, n'appartenant pas à la famille des clathrines, ont également été identifiées au niveau du trans-Golgi (p200, p62, p230, pour revue voir (Keller and Simons 1997)), mais leur rôle dans la formation de vésicules n'a pas été démontré non plus.

2-2-2-2 Adressage aux membranes apicales : mise en jeu des *lipid rafts*

La voie du transport apical fait intervenir des microdomaines membranaires très particuliers, enrichis en sphingolipides et en cholestérol, appelés *rafts* (pour revue (Simons and Ikonen 1997)). Les *rafts* se forment par des interactions spécifiques entre les groupements carbonnés des glycosphingolipides, et des molécules de cholestérol s'intercalent entre leurs chaînes lipidiques (Figure 6).

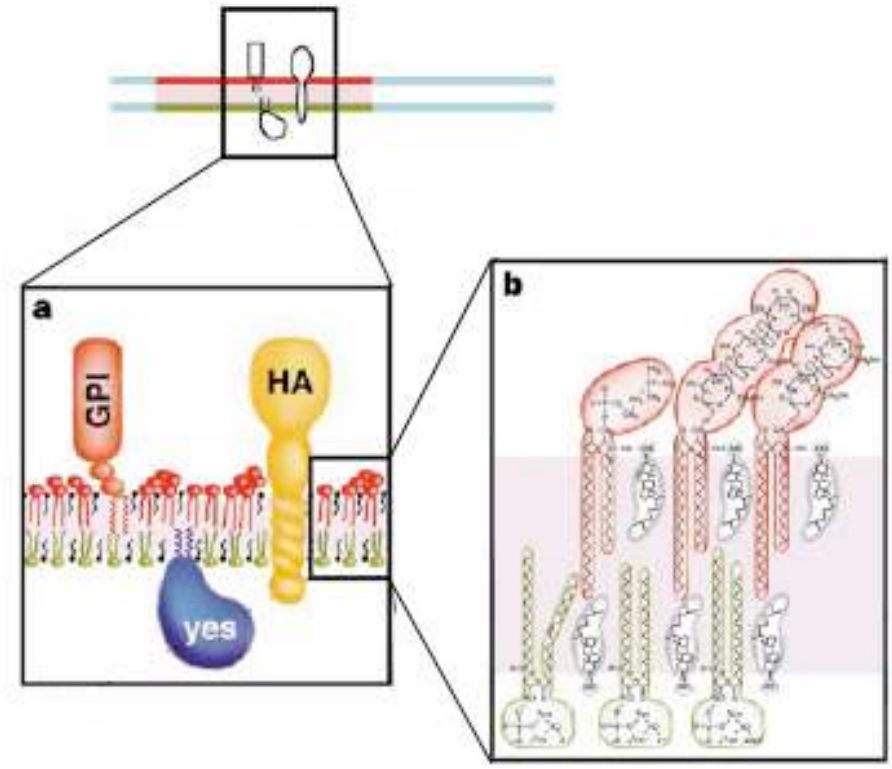


Figure 6 : Organisation des *lipid rafts* au sein d'une membrane.
Les *rafts* (en rouge) forment des domaines particuliers au sein de la membrane. (a) Les *rafts* contiennent des protéines qui sont associées à la membrane soit par leur ancre GPI, soit par leur groupement acyl (la kinase yes est représentée), soit par leur domaine transmembranaire (la protéine HA du virus de la grippe est représentée). (b) La bicouche lipidique formant les *rafts* a une organisation asymétrique : la sphingomyéline et des glycosphingolipides (en rouge) sont enrichis dans le feuillet exoplasmique, alors que le feuillet cytoplasmique est enrichi en glycérolipides (en vert). Les deux feuillets de la bicouche lipidique renferment des molécules de cholestérol (en gris), qui s'intercalent entre les chaînes lipidiques. D'après (Simons and Ikonen 1997).

Une méthode de préparation de ces domaines a été mise au point, fondée sur le fait que les *rafts* ne sont pas solubles en présence de Triton-X100 à 4°C : ils forment des complexes

enrichis en glycolipides, appelés *Detergent Resistant Membranes* (DRM), qui peuvent être séparés sur gradient de densité. Si les DRM ne contiennent pas toutes les protéines des *rafts*, ils en constituent pour le moins une sous-population représentative (Brown and London 1998). Dans les cellules de mammifères, ces complexes sont fortement enrichis en protéines apicales, ce qui suggère leur implication dans cette voie de transport (Simons and Ikonen 1997). Les protéines peuvent être incorporées aux *rafts* selon diverses modalités. Les protéines ayant un ancrage GPI s'associent aux *rafts* par les chaînes acylées de l'ancre GPI ; d'autres protéines interagissent directement avec les *rafts* par leur domaine transmembranaire. Enfin, certaines protéines peuvent se lier aux *rafts* par le biais de l'interaction entre un sucre qu'elles portent en N glycosylation et une lectine localisée dans les *rafts* (Fiedler, Parton *et al.* 1994; Benting, Rietveld *et al.* 1999). Toutefois, toutes les protéines apicales ne transitent pas par les *rafts* (Nelson and Yeaman 2001), ce qui suggère l'existence d'une voie de transport apical indépendante des *rafts*. Par ailleurs, les *rafts* participent à d'autres processus cellulaires que l'adressage de protéines. En particulier, il a été montré que les *rafts* permettent de séparer physiquement les protéines impliquées dans les voies de signalisation intracellulaire, ce qui pourrait permettre une régulation très fine du fonctionnement de ces voies de signalisation (Brown and London 1998).

Ainsi, il existe au moins deux routes principales d'adressage des protéines du trans-Golgi vers la membrane plasmique : la voie basolatérale, mettant en jeu des vésicules et des récepteurs qui reconnaissent des déterminants cytoplasmiques, et la voie apicale, qui implique les *rafts*, auxquels les protéines sont incorporées en fonction de déterminants transmembranaires ou exoplasmiques (ancre GPI, N-glycosylation). Mais cette distinction reste schématique et masque une certaine diversité : les voies basales et apicales peuvent différer d'un type cellulaire à l'autre. L'hépatocyte, en particulier, a une voie apicale indirecte, qui adresse d'abord les protéines à la membrane basolatérale, avant de les transférer par endocytose vers la membrane apicale. De même, au moins trois voies de transport entre l'appareil de Golgi et la membrane plasmique ont été décrites chez la levure (Harsay and Bretscher 1995; Roberg, Rowley *et al.* 1997).

2-2-2-3 : Le rôle des *rafts* dans un érythrocyte parasité par *P. falciparum*

La présence de *rafts* à la surface du globule rouge sain et dans les structures membranaires intracellulaires du globule rouge parasité par *P. falciparum* a été mise en évidence. Plusieurs arguments suggèrent que les *rafts* participent au transport des protéines exportées dans le

cytoplasme du globule rouge. Nous aurons l'occasion de revenir sur ce processus de transport des protéines hors du parasite. Les *rafts* participent également à plusieurs autres processus cellulaires importants : l'invasion du globule rouge sain et la formation de la membrane de la vacuole parasitophore, et l'assimilation de nutriments.

Le globule rouge sain lui-même possède des *rafts*, au sein de sa membrane plasmique, qui sont des acteurs importants de l'invasion par *P. falciparum* : lorsqu'ils sont dissociés, l'invasion est inhibée à plus de 80 % (Samuel, Mohandas *et al.* 2001). Le mécanisme de cette inhibition pourrait être lié au fait que les DRM du globule rouge contiennent un certain nombre de protéines impliquées dans les voies de signalisation, dont une protéine G trimérique qui participe à l'établissement de l'infection par *P. falciparum* (Harrison, Samuel *et al.* 2003). La dissociation des DRM du globule rouge pourrait également altérer la formation de la vacuole parasitophore, sur laquelle nous reviendrons par la suite. La présence de *rafts* a également été mise en évidence au niveau de la membrane plasmique du mérozoïte (Wang, Mohandas *et al.* 2003), et l'étude de leur composition protéique suggère leur implication dans le processus d'invasion. En effet, ces DRM contiennent plusieurs protéines impliquées dans le processus d'invasion du globule rouge sain : MSP-1, MSP-2, MSP-4, MSP-5 et MSP-8. Celles-ci participent soit à la reconnaissance de la cellule hôte, soit à l'attachement entre le parasite et l'érythrocyte. Les auteurs proposent que l'incorporation de protéines au sein des *rafts* favorise les interactions protéiques avec les récepteurs de la cellule hôte en concentrant les protéines dans un domaine délimité de la membrane. Par exemple, l'interaction entre MSP-1 et son récepteur érythrocytaire (probablement la glycophorine A), qui est de faible affinité, pourrait être favorisée par une forte concentration locale de MSP-1 (Wang, Mohandas *et al.* 2003). Par ailleurs, des études de microscopie électronique ont mis en évidence des structures similaires à des cavéoles dans le cytoplasme et la vacuole parasitophore de trophozoïtes (Olliaro and Castelli 1997). Les cavéoles sont des invaginations membranaires enrobées de cavéoline, une protéine fortement enrichie dans les DRM, et elles peuvent intervenir dans des processus de transport vésiculaire (Pelkmans and Helenius 2002). Ainsi, les *rafts* pourraient constituer une voie originale d'assimilation de nutriments, susceptible d'être très utile au parasite dans la mesure où le globule rouge parasité ne réalise aucune endocytose (Haldar, Samuel *et al.* 2001).

2-2-2-4 Adressage vers les granules de sécrétion

Deux modèles de tri sont proposés pour décrire l'adressage des protéines vers les granules de sécrétion. L'un d'eux repose sur une hypothèse de tri sélectif des protéines à la sortie du trans-

Golgi : les protéines destinées aux granules de sécrétion interagissent avec un récepteur spécifique, localisé dans la membrane du trans-Golgi, qui reconnaît non pas des motifs peptidiques linéaires, mais certaines conformations spatiales. Certaines protéines destinées aux granules de sécrétion, qui interagissent avec la membrane du trans-Golgi, pourraient à leur tour servir de récepteur pour d'autres protéines des granules (Thiele, Gerdes *et al.* 1997). L'autre modèle propose que les protéines sont intégrées de façon non sélective aux granules de sécrétions immatures, et que le tri a lieu dans un second temps. Les protéines non destinées aux granules de sécrétions seraient en effet éliminées des granules immatures au moyen de vésicules à clathrine émergeant à leur surface (pour revue (Simons and Ikonen 1997)).

2-2-2-5 Adressage de protéines parasitaires vers l'apicoplaste

L'apicoplaste de *P. falciparum*, qui résulte de l'endosymbiose secondaire d'une algue eucaryote, est l'homologue évolutif du chloroplaste chez les plantes (McFadden, Reith *et al.* 1996). Il est entouré de quatre membranes, et la question de l'adressage à l'apicoplaste des protéines codées par le génome nucléaire s'avère d'autant plus intéressante que l'apicoplaste possède des caractéristiques procaryotes, qui pourraient être exploitées pour la définition de cibles thérapeutiques. L'adressage à ce compartiment se fait en deux temps, avec d'abord un signal d'adressage amino-terminal bipartite, qui consiste en un peptide signal classique et confère l'adressage vers le RE. Ensuite, un peptide de transit permet l'adressage depuis le système de sécrétion vers l'apicoplaste (Waller, Reed *et al.* 2000). La protéine pénètre d'abord dans le RE grâce à son peptide signal, qui sera clivé, ne laissant que le peptide de transit à l'extrémité amino-terminale de la protéine. À la sortie de l'appareil de Golgi, celle-ci est intégrée à des vésicules de transport qui fusionnent spécifiquement avec la membrane externe de l'apicoplaste sous l'action de signaux portés par le peptide de transit. Le peptide de transit des protéines plasmodiales étant globalement chargé positivement (Foth, Ralph *et al.* 2003), il est probable que la protéine traverse ensuite les 3 membranes restantes de l'apicoplaste à travers des pores membranaires préférentiellement perméables aux protéines chargées positivement. Le peptide de transit est ensuite clivé par une enzyme du stroma de l'apicoplaste. Ainsi, contrairement au cas des protéines mitochondriales, les protéines adressées à l'apicoplaste empruntent la voie de sécrétion classique du RE et de l'appareil de Golgi.

2-2-3 Aspects moléculaires du transport vésiculaire

2-2-3-1 La formation de vésicules à la surface de l'appareil de Golgi

Le transport antérograde de protéines au sein de l'appareil de Golgi et le transport rétrograde, entre l'appareil de Golgi et le RE, utilisent la même machinerie : il s'agit des protéines de la famille COPI, qui forment des vésicules selon un processus similaire à ce qui a été décrit pour les COPII (Figure 7). La petite protéine G Arf1 est équivalente à Sar1p : cytoplasmique sous sa forme liée à du GDP, elle est recrutée à la membrane de l'appareil de Golgi par son interaction avec p23 et p24, des protéines transmembranaires de l'appareil de Golgi. Arf1 échange ensuite son GDP pour du GTP, selon une réaction catalysée par des protéines Arf-GEF (guanine nucleotide exchange factor). Contrairement au cas des protéines COPII, il existe plusieurs protéines Arf-GEF. La forme de Arf1 liée au GTP est membranaire, elle se détache de p23 et recrute les protéines COPI. Les protéines COPI sont présentes dans le cytoplasme sous la forme de complexes composés de 7 sous-unités pré-assemblées. Les complexes COPI et Arf1-GTP polymérisent, ce qui induit une courbure de la membrane sous-jacente, et permet l'individualisation d'une vésicule de transport. Lorsque la membrane est suffisamment incurvée, une protéine de la famille Arf-GAP (GTPase activating protein) qui ne fait pas partie du complexe COPI est recrutée, et Arf1-GTP échange son GTP (Bigay, Gounon *et al.* 2003). Le fait que Arf1 passe sous la forme GDP induit la dépolymérisation du manteau de la vésicule, qui se retrouve alors nue. (Pour revue, (van Vliet, Thomas *et al.* 2003)). Chez *P. falciparum*, des protéines homologues à δ-COP, une protéine du complexe COPI et à Arf1 ont été identifiées dans le cytoplasme du parasite, ce qui suggère que ce processus de transport vésiculaire est conservé (Stafford, Stockley *et al.* 1996; Adisa, Rug *et al.* 2002). Le recrutement des protéines cargo est bien connu pour les protéines résidentes du RE : l'interaction entre leur motif conservé KKXX (ou KXKXX) et une ou plusieurs sous-unités du complexe COPI permet leur incorporation à des vésicules rétrogrades. Certains signaux de rétention des protéines dans l'appareil de Golgi ont également été caractérisés, mais le mécanisme de rétention reste méconnu. De plus, la grande diversité des protéines résidentes de l'appareil de Golgi laisse à penser que plusieurs types de signaux et de mécanismes participent au maintien des protéines dans ce compartiment (van Vliet, Thomas *et al.* 2003). Par ailleurs, une nouvelle voie de transport entre l'appareil de Golgi et le RE a été récemment mise en évidence. Elle est indépendante de la voie des COPI, ce qui illustre à nouveau la diversité et la redondance des voies de transport (Girod, Storrie *et al.* 1999).

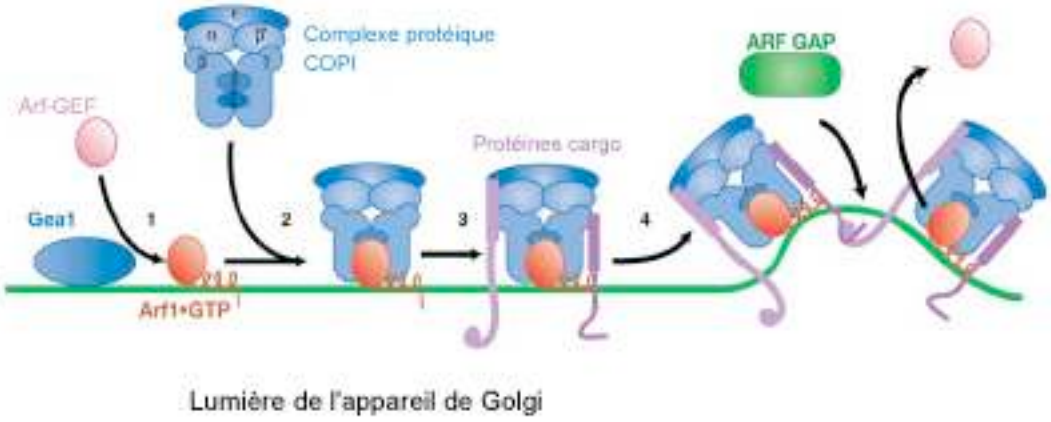


Figure 7 : Formation d'une vésicule enrobée de protéines de la famille COPI à la surface de l'appareil de Golgi.
(1) La protéine Arf1 est recrutée à la membrane de l'appareil de Golgi et activée par son interaction avec Arf-GEF, qui sert de donneur de GTP. (2) Elle recrute les protéines COPI. (3) Le complexe COPI recrute lui-même les protéines cargo en interagissant avec leur domaine cytosolique. (4) Les protéines COPI et Arf-GTP polymérisent, ce qui entraîne une déformation de la membrane du RE, et la formation d'une vésicule. Une protéine de la famille Arf-GAP est finalement recrutée, et hydrolyse le GTP porté par Arf ; cela entraîne la dépolymérisation du manteau de la vésicule. D'après (Lee, Miller *et al.* 2004).

2-2-3-2 L'attachement et la fusion des vésicules avec la membrane cible

Ce processus est commun à toutes les vésicules, qui perdent leurs protéines d'enrobage peu après leur émergence et sont alors qualifiées de nues.

L'*attachement* de la vésicule de transport avec la membrane de fusion met généralement en jeu des protéines Rab-GTPases. Comme nous l'avons mentionné précédemment, de nombreuses protéines homologues des protéines Rab ont été identifiées et caractérisées chez *P. falciparum*. Sous leur forme liée au GDP elles sont cytoplasmiques, et leur forme liée au GTP est recrutée à la membrane de vésicules. Les Rabs sont toujours liées à la membrane des vésicules donneuses, et interagissent avec divers effecteurs, souvent organisés en complexes au niveau de la membrane cible. C'est la nature des protéines Rab impliquées dans l'accrochage des vésicules qui confère à la fusion membranaire sa spécificité (Chen and Scheller 2001).

Une fois l'accrochage des membranes réalisé, leur *fusion* peut commencer. Les protéines de la famille SNARE (*Soluble NSF Attachment Protein Receptor*, et NSF signifie *N-éthylmaléimide Sensitive Fusion protein*) sont les principaux acteurs du processus de fusion entre deux membranes (pour revue, (Lee, Miller *et al.* 2004)). Elles présentent une grande

diversité de structure et de taille, mais possèdent toutes un motif commun, appelé SNARE, constitué de 60 à 70 acides aminés, avec huit répétitions de sept résidus typiques des motifs *coiled-coil*. La plupart des SNARE ont un domaine transmembranaire carboxy-terminal. Quatre à huit protéines SNARE sont réparties entre les membranes donneuse et cible. Lorsque les interactions entre les protéines Rab ont suffisamment rapproché les deux membranes, les domaines SNARE des protéines situées en trans s'associent spontanément à la manière d'une fermeture à glissière hydrophobe, pour former un complexe extrêmement stable. Ce complexe induit une force de tension superficielle suffisante pour initier la fusion des deux membranes (Figure 8). Il est également possible que d'autres domaines des SNARE favorisent ce processus : par exemple, des résidus basiques situés à proximité du domaine transmembranaire des SNAREs seraient susceptibles de déstabiliser la membrane (Sutton, Fasshauer *et al*. 1998). De nombreux gènes spécifiant des protéines SNARE putatives ont été annotés dans le génome de *P. falciparum*, ce qui suggère que la fusion des vésicules se fait selon la voie classique des SNARE.

Lorsque la fusion membranaire est réalisée, le complexe des SNARE est en cis, et il doit être *dissocié* pour pouvoir être recyclé. Ce processus, qui nécessite de l'énergie, est réalisé par la protéine NSF, qui a une activité ATPasique, et son cofacteur SNAP (Soluble NSF Attachment Protein). Les SNARE ainsi réactivées sont alors recyclées dans des vésicules avec la membrane de vésicules donneuses. (Jahn, Lang *et al*. 2003) (Figure 8). Un homologue de NSF, qui est fonctionnel, a été caractérisé chez *P. falciparum*, localisé en majorité dans le cytoplasme du parasite (Hayashi, Taniguchi *et al*. 2001). Par ailleurs, un gène spécifiant une protéine homologue au facteur SNAP a été annoté dans le génome du de *P. falciparum*.

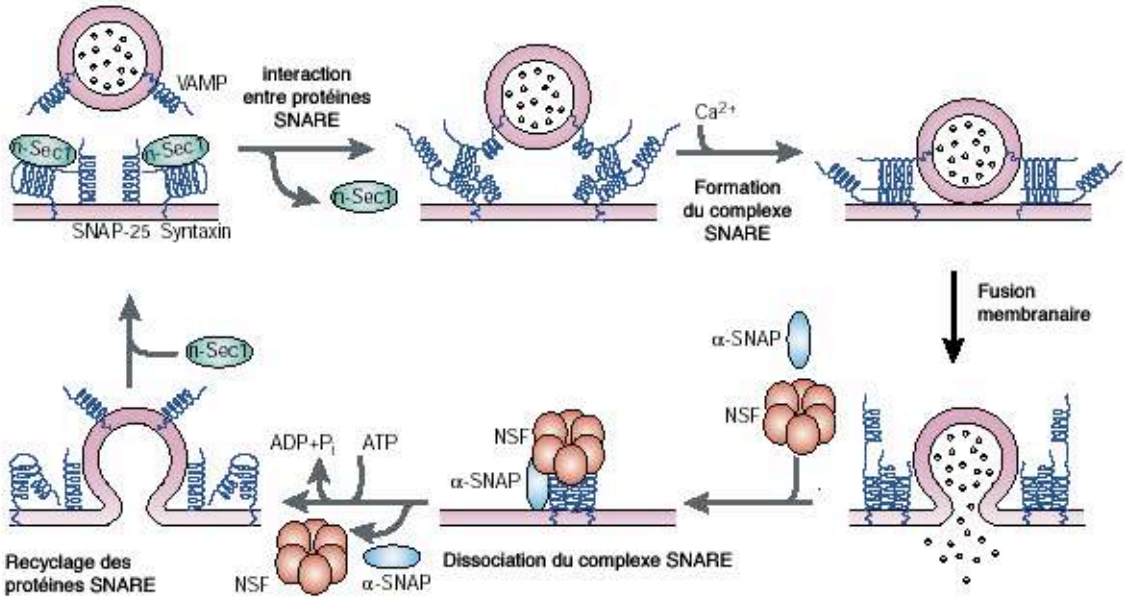


Figure 8 : Mécanisme moléculaire de la fusion membranaire mettant en jeu les protéines SNARE.
La membrane de la vésicule interagit avec la membrane receceuse par le biais de protéines Rab (non représentées). Lorsque les deux membrane sont suffisamment rapprochées, les protéines SNARE (ici VAMP, SNAP-25 et syntaxine) interagissent en trans pour former un complexe stable qui déforme les membranes et induit la fusion membranaire. Le complexe est ensuite recyclé sous l'action ATPasique de la protéine NSF et de son cofacteur SNAP. Les SNARE ainsi réactivées sont ensuite recyclées dans des vésicules. Sec-1 est une protéine chaperon. SNARE : Soluble NSF Attachment Protein Receptor ; NSF : N-éthylmaléimide Sensitive Fusion protein ; SNAP : Soluble NSF Attachment Protein. D'après (Lee, Miller *et al*. 2004).

2-2-4 La sécrétion par défaut à la sortie de l'appareil de Golgi de *P. falciparum*

Le parasite est séparé du cytoplasme du globule rouge par un compartiment particulier, la vacuole parasitophore, qui se forme lors de l'invasion du globule rouge sain par le parasite. La vacuole parasitophore constitue l'équivalent du milieu extracellulaire pour le parasite, et il est donc logique de supposer que les protéines soient exportées vers ce compartiment à la sortie de l'appareil de Golgi. Nous allons préciser l'organisation de la vacuole parasitophore avant de montrer comment cette hypothèse a été validée.

2-2-4-1 La vacuole parasitophore

La formation de la vacuole parasitophore est initiée par l'invagination de membrane du globule rouge lors de l'invasion par le mérozoïte. Il s'agit d'un processus actif et sélectif, qui n'incorpore que certaines protéines de la cellule hôte (Lauer, VanWye *et al*. 2000). Toutes les

protéines incorporées à la membrane de la vacuole parasitophore décrites à ce jour font partie des *rafts* de la membrane du globule rouge, mais inversement, toutes les protéines des DRM du globule rouge ne sont pas incorporées dans la membrane de la vacuole parasitophore (Murphy, Samuel *et al.* 2003). La membrane de la vacuole parasitophore contient aussi des protéines parasitaires. Certaines seront néosynthétisées, alors que d'autres sont apportées par les rhoptries du mérozoïte lors de l'invasion : RhopH2 et la Pfstomatine, protéine homologue de la stomatine chez *P. falciparum* sont incorporées au feuillet cytoplasmique de la membrane de la vacuole parasitophore (Hiller, Akompong *et al.* 2003). Ces protéines sont également associées à des *rafts*, ce qui souligne l'importance fonctionnelle de ces domaines membranaires particuliers dans la formation de la vacuole parasitophore.
Les lipides de la membrane de la vacuole parasitophore ont également une origine double : certains proviennent de la membrane du globule rouge (Ward, Miller *et al.* 1993), et d'autres sont issus des organites du complexe apical du mérozoïte (rhoptries et granules denses) (Dubremetz, Garcia-Reguet *et al.* 1998).

2-2-4-2 La sécrétion des protéines se fait par défaut dans la vacuole parasitophore

La question du devenir des protéines engagées dans l'appareil de sécrétion de *P. falciparum* n'est pas aussi simple qu'il y paraît. S'il est en effet logique de supposer que ces protéines sont sécrétées dans la vacuole parasitophore, certaines observations morphologiques ont aussi laissé penser que par endroits les membranes du parasite et de la vacuole parasitophore sont fortement accolées, permettant aux protéines destinées au cytoplasme du globule rouge d'y accéder directement sans transiter par la vacuole parasitophore (Gormley, Howard *et al.* 1992; Elmendorf and Haldar 1993). Depuis, les arguments s'accumulent en faveur du modèle de sécrétion via la vacuole parasitophore. En effet, toutes les protéines exportées dans le cytoplasme du globule rouge et dont le transport a été étudié sont d'abord sécrétées dans la vacuole parasitophore. C'est le cas notamment de la *glycophorine binding protein* (Ansorge, Benting *et al.* 1996), de HRPI (Wickham, Rug *et al.* 2001), et de PfExp1 (Adisa, Rug *et al.* 2003), une protéine majoritairement localisée dans la vacuole parasitophore, mais dont une fraction est exportée dans des structures membranaires du cytoplasme du globule rouge. La mise au point de techniques de transfection chez *P. falciparum* a permis de déterminer qu'un peptide signal constitue le signal minimal d'adressage à la vacuole parasitophore. En effet, la séquence signal classique de PfExp1 est nécessaire et suffisante pour adresser une protéine GFP chimérique à la vacuole parasitophore (Adisa, Rug *et al.* 2003), et il en est de même pour la séquence signal interne de HRPI (Wickham, Rug *et al.* 2001), et de HRPII (Lopez-Estrano,

Bhattacharjee *et al.* 2003). D'autres déterminants, sur lesquels nous allons revenir, interviennent ensuite pour le transport dans le cytoplasme du globule rouge. Il apparaît donc que les séquences signal atypiques sont fonctionnellement équivalentes aux séquences signal classiques et n'interviennent pas directement dans l'adressage des protéines vers le cytoplasme du globule rouge. Ces études suggèrent donc que toutes les protéines destinées à la vacuole parasitophore et au cytoplasme du globule rouge empruntent au départ la voie de sécrétion classique, et que leur tri s'effectue au niveau de la vacuole parasitophore.

Toutefois, certains auteurs ont proposé l'existence d'une voie de sécrétion alternative des protéines exportées dans le cytoplasme du globule rouge. Ce modèle repose sur des observations morphologiques de l'effet d'un court traitement par la Brefeldine A (BFA). Cette drogue inhibe la formation de vésicules enrobées de protéines COPI en bloquant l'échange de GDP au niveau de la protéine Arf1, et induit donc une réorganisation profonde de l'appareil de Golgi. Les auteurs ont décrit l'accumulation de protéines destinées aux compartiments intra-parasitaires dans le RE classique, alors que les protéines destinées à la vacuole parasitophore et au globule rouge sont localisées à l'intérieur d'un compartiment particulier induit par la BFA (Wiser, Lanners *et al.* 1997). Si ce compartiment est morphologiquement distinct du RE, il en contient tout de même certains éléments, dont PfBiP. Il semble donc que ce compartiment constitue un domaine particulier du RE, plutôt qu'un compartiment isolé (Cortes, Winograd *et al.* 2003). Cependant, Wickham et collègues ont montré qu'après un long traitement à la BFA, la protéine GFP, qu'elle soit précédée du peptide signal de HRPI qui confère l'adressage à la vacuole parasitophore, ou de la séquence amino-terminale complète de HRPI qui confère l'export vers le cytoplasme du globule rouge, colocalise parfaitement avec un marqueur du RE (Wickham, Rug *et al.* 2001). Les auteurs expliquent cette apparente contradiction en proposant que les différents sous domaines du RE fusionnent après plusieurs heures d'exposition à la BFA.

Ainsi, les protéines destinées à la vacuole parasitophore et au cytoplasme du globule rouge semblent toutes transiter par le RE. Mais l'hypothèse d'un tri précoce des protéines exportées dans le cytoplasme du globule rouge reste possible. En effet, des études de microscopie confocale suggèrent que la vacuole parasitophore est compartimentée, et que les protéines résidentes de la vacuole parasitophore sont physiquement séparées des protéines exportées, qui sont confinées dans différents domaines de la vacuole parasitophore (Wickham, Rug *et al.* 2001; Spielmann, Fergusen *et al.* 2003).

Le transport intracellulaire de protéines chez *P. falciparum* met donc en jeu des éléments de la voie de sécrétion classique : bien que le RE et l'appareil de Golgi aient une organisation atypique, la plupart de leurs fonctions biologiques semblent conservées, ainsi que les mécanismes moléculaires du transport vésiculaire. L'incorporation d'une protéine à la voie de sécrétion dans le RE peut se faire par le biais d'une séquence signal classique, mais aussi d'une séquence signal interne, relativement courante chez *P. falciparum,* et qui semble avoir le même rôle fonctionnel. Par défaut, les protéines sont exportées dans la vacuole parasitophore, le compartiment qui entoure le parasite. Des signaux spécifiques sont nécessaires pour l'adressage vers d'autres organites, ainsi que pour l'export vers le cytoplasme ou la membrane du globule rouge. Nous allons à présent détailler les mécanismes du transport des protéines au-delà de la membrane plasmique du parasite, dans le cytoplasme du globule rouge, jusqu'à la membrane plasmique de la cellule hôte.

III- L'adressage et le transport de protéines hors du parasite

La cellule hôte de *P. falciparum* ne réalise aucun transport intracellulaire de protéines, ce qui signifie que le parasite met en place lui-même une machinerie de transport de protéines au-delà de sa membrane plasmique. Nous allons voir de quelle façon le parasite résout ce problème topologique.

1- L'adressage au-delà de la membrane de la vacuole parasitophore

1-1 Pexel, le signal d'export dans le cytoplasme du globule rouge

Des expériences de transfection, avec des constructions chimériques fusionnant les séquences amino-terminales des protéines HRPI et HRPII à la GFP, ont montré que les 60 résidus en aval du peptide signal sont nécessaires au franchissement de la membrane de la vacuole parasitophore (Wickham, Rug *et al.* 2001; Lopez-Estrano, Bhattacharjee *et al.* 2003). Ces travaux ont permis d'orienter les recherches bioinformatiques qui se sont concentrées sur ce domaine des protéines exportées. De fait, dans deux études indépendantes récentes (Hiller, Bhattacharjee *et al.* 2004; Marti, Good *et al.* 2004), les auteurs ont aligné la région amino-terminale de plusieurs protéines exportées dans le cytoplasme ou la membrane du globule rouge, et ont identifié un motif pentapeptidique conservé, situé moins de 100 résidus en aval

du peptide signal, appelé Pexel (*Plasmodium export element*). Il porte en première position un acide aminé chargé positivement et hydrophile : arginine le plus souvent, ou lysine; en troisième position un résidu hydrophobe, leucine ou isoleucine est également très conservé. La cinquième position comporte en général un résidu aspartate, glutamate, ou glutamine. En deuxième et quatrième positions, on retrouve des acides aminés non chargés. Les auteurs ont montré par des études de transfection que ce motif Pexel constitue un signal d'adressage nécessaire et suffisant pour le franchissement de la membrane de la vacuole parasitophore. Ceci est valable pour les protéines solubles aussi bien que membranaires, et une séquence signal n'est pas forcément requise en amont du Pexel : la protéine transmembranaire du globule rouge PfEMP1 qui est dépourvue de séquence signal possède un motif Pexel, indispensable pour son transport au-delà de la vacuole parasitophore. Néanmoins, toutes les protéines exportées ne possèdent pas un motif Pexel : c'est le cas notamment de PfSBP1, PfExp1, et des protéines COPII. Il existe donc probablement des mécanismes de transport alternatifs.

Le mécanisme moléculaire du franchissement de la membrane de la vacuole parasitophore n'est pas encore caractérisé. Des études antérieures ont montré que ce transport nécessite de l'ATP (Ansorge, Benting *et al.* 1996). Depuis, une protéine de type *ATP Binding Cassette* a été identifiée chez *P. falciparum*, et celle-ci est exportée dans la vacuole parasitophore et plusieurs autres régions membranaires du cytoplasme du globule rouge parasité (Bozdech, VanWye *et al.* 1998). Cette protéine, appelée PfGCN20, pourrait donc être impliquée dans le transport des protéines parasitaires à travers la membrane de la vacuole parasitophore. Il ne fait aucun doute que ce transporteur, étant nécessaire à l'export de la quasi-totalité des protéines exportées par le parasite constitue une cible thérapeutique de tout premier intérêt. Dans cette optique, le fait que cette protéine ait une forte similarité avec des transporteurs bactériens (43 % d'identité avec la protéine vgA de *Staphylococcus aureus*) est plutôt encourageant pour la mise au point d'inhibiteurs spécifiques n'affectant pas les activités de l'hôte.

Deux modèles sont envisageables pour expliquer l'export de protéines dépourvues de Pexel. Un mécanisme de transport mettant en jeu une protéine escorte, qui se lie à d'autres protéines pour les guider vers leur destination finale a été proposé pour des protéines de rhoptries (Baldi, Andrews *et al.* 2000), ainsi que pour PfEMP1. En effet, Waterkeyn et collègues ont montré que PfEMP1 n'est pas adressée à la membrane du globule rouge lorsqu'une forme tronquée de PfEMP3 est exprimée, alors que le transport de cette dernière n'est pas affecté

(Waterkeyn, Wickham *et al.* 2000). Ceci suggère que l'interaction avec PfEMP3 est nécessaire au transport de PfEMP1. Par ailleurs, Cooke et collègues ont décrit récemment des vésicules à double membrane, bourgeonnant à la surface du système de sécrétion du parasite, et dont la membrane externe fusionnerait avec la membrane plasmique du parasite, conduisant à la libération d'une vésicule dans la vacuole parasitophore (Cooke, Lingelbach *et al.* 2004). Il est possible que cette vésicule fusionne ensuite avec la membrane de la vacuole parasitophore, et exporte ainsi des protéines dépourvues de Pexel dans le cytoplasme du globule rouge.

1-2 L'adressage dépend aussi du moment auquel est synthétisée la protéine

Les premiers travaux montrant qu'une protéine n'est pas adressée vers les mêmes compartiments intracellulaires selon le moment auquel elle est synthétisée ont été réalisés sur des granulophiles (Le Cabec, Cowland *et al.* 1996). Le même phénomène a été décrit chez *Plasmodium berghei,* pour AMA-1, une protéine des granules denses (Kocken, van der Wel *et al.* 1998), et a depuis été mis en évidence chez *P. falciparum* (Rug, Wickham *et al.* 2004). Les auteurs ont étudié le transport de RESA, protéine exportée dans le cytoplasme du globule rouge, en réalisant des expériences de transfection avec des constructions chimériques. Le gène spécifiant la protéine marqueur GFP est placé en aval de la région amino-terminale de la protéine RESA et d'un promoteur : il peut s'agir soit du promoteur endogène, auquel cas la GFP est exprimée au stade schizonte, soit du promoteur de la protéine PfHSP86, et la GFP est alors exprimée au stade trophozoïte. De façon tout à fait intéressante, la GFP est exportée dans le cytoplasme du globule rouge lorsqu'elle est synthétisée au stade schizonte, alors qu'elle reste dans la vacuole parasitophore si elle est synthétisée au stade trophozoïte. Le modèle du transport de protéines qui utilise des protéines escortes que nous avons décrit précédemment pourrait expliquer qu'une protéine est adressée vers des compartiments différents selon le moment auquel elle est synthétisée. En effet, il est possible qu'une protéine escorte transportant les protéines vers un compartiment donné soit présente à un stade du cycle érythrocytaire seulement, et qu'en son absence les protéines ne soient pas transportées, ou interagissent avec d'autres protéines escorte, qui transportent les protéines vers d'autres destinations.

1-3 Rôle possible des modifications lipidiques des protéines et des *lipid rafts*

Une étude récente a mis en évidence l'existence d'une voie de transport de protéines plasmodiales dans le cytoplasme du globule rouge reposant sur la présence de modifications lipidiques (Moskes, Burghaus *et al.* 2004), indépendante du système de sécrétion classique.

Les auteurs ont étudié la protéine PfCDPK1 (*calcium dependant protein kinase*), qui est transportée dans les structures membranaires du cytoplasme du globule rouge. La protéine n'a pas de domaine transmembranaire, ni de peptide signal, ni de Pexel mais elle possède trois signaux potentiels d'interaction avec une membrane : un site de myristylation, un site de palmitylation, et un motif formé d'acides aminés basiques, susceptibles d'interagir avec les groupements phosphate des phospholipides membranaires (Resh 1999). Ces trois signaux, généralement portés par des protéines associées aux *lipid rafts*, sont nécessaires au transport au-delà de la vacuole parasitophore : la mutation d'un seul d'entre eux entraîne l'accumulation de la protéine dans la vacuole parasitophore. Les propriétés de ce mécanisme de transport évoquent le cas du transport de la flotilline 1, une protéine adressée vers les *rafts* de la membrane plasmique dans divers types cellulaires. Son adressage, indépendant de la voie classique, repose sur l'ajout d'un groupement palmitate au niveau d'un domaine particulier de la protéine, appelé PHB (Morrow, Rea *et al*. 2002). Ces résultats suggèrent donc l'existence d'une voie de transport des protéines plasmodiales impliquant les *rafts* de la vacuole parasitophore, permettant le transport de protéines myristylées et/ou palmitylées vers des structures membranaires du cytoplasme du globule rouge. Le fait que la première protéine décrite utilisant cette voie de transport soit une protéine kinase est extrêmement intéressant ; en effet, nous avons déjà évoqué le rôle des *rafts* dans des processus de signalisation intracellulaire, et ce résultat incite à étudier l'adressage d'autres protéines de signalisation (des phosphatases en particulier) en recherchant des motifs de myristylation et de palmitylation

2- Les structures membranaires dans le cytoplasme du globule rouge

La présence de structures membranaires variées dans le cytoplasme du globule rouge parasité par *P. falciparum* a été décrite dans des études de microscopie déjà anciennes (Trager, Rudzinska *et al*. 1966; Langreth, Jensen *et al*. 1978; Atkinson and Aikawa 1990). Ces structures suscitent un intérêt grandissant depuis que leur rôle dans le transport de protéines parasitaires à la membrane du globule rouge a été établi (pour revue (Przyborski, Wickert *et al*. 2003)). Parmi ces structures, on distingue le *Tubo-Vesicular Network*, ou TVN, constitué d'éléments tubulaires émergeant depuis la membrane de la vacuole parasitophore, et les structures de Maurer, qui apparaissent en microscopie électronique sous la forme de vésicules localisées à proximité de la membrane plasmique du globule rouge.

2-1 Le *Tubo-Vesicular Membrane Network*, une structure participant à l'import de molécules

De nombreuses études de microscopie optique et électronique (Langreth, Jensen *et al.* 1978) (Haldar, de Amorim *et al.* 1989; Grellier, Rigomier *et al.* 1991) (Elmendorf and Haldar 1994) s'accordent à conclure que le TVN est formé d'un réseau de vésicules et de tubules membranaires qui sont en continuité avec la membrane de la vacuole parasitophore et peuvent s'étendre dans tout le cytoplasme du globule rouge, parfois à proximité de la membrane plasmique érythrocytaire. Le TVN apparaît très tôt après l'invasion (Langreth, Jensen *et al.* 1978) (Atkinson, Aikawa *et al.* 1987), et persiste jusqu'au moment de la différenciation des mérozoïtes (Haldar, Mohandas *et al.* 2002). Certaines protéines du TVN ont été identifiées, en particulier la sphingomyéline synthase (Elmendorf and Haldar 1994), une enzyme caractéristique de l'appareil de Golgi. Parce que le TVN apparaît comme un compartiment charnière entre le parasite et le milieu extracellulaire, certains auteurs ont étudié son importance fonctionnelle. Lauer et collègues ont montré que l'inhibition de la sphingomyéline synthase abolit la formation du TVN (Lauer, Ghori *et al.* 1995) ; l'import de nutriments est alors inhibé, mais pas l'export de protéines (Lauer, Rathod *et al.* 1997). D'autres études suggèrent que le TVN est aussi impliqué dans l'import de cholestérol et de protéines transmembranaires du globule rouge, deux composés qui sont incorporés à la membrane de la vacuole parasitophore (Lauer, VanWye *et al.* 2000). En effet, ce processus, qui conduit à un transfert de protéines entre les *rafts* de la membrane du globule rouge et ceux de la membrane de la vacuole parasitophore, est sensible aux inhibiteurs de sphingomyéline synthase. Le TVN apparaît donc comme une structure impliquée dans l'import de diverses molécules : des nutriments (nucléosides, acides aminés), des protéines, et du cholestérol.

2-2 Les structures de Maurer

Les structures de Maurer ont été initialement observées en microscopie optique au sein du cytoplasme de globules rouges parasités par *P. falciparum*, colorés par la technique de Giemsa. Leur nature a été controversée : elles représentaient pour certains des débris du parasite, pour d'autres des fragments nucléaires, et c'est Maurer qui le premier suggéra qu'il pouvait s'agir de modifications ultrastructurales du globule rouge induites par le parasite (Maurer 1900). Trager établit la relation entre ces structures de Maurer et les structures membranaires observées en microscopie électronique dans le cytoplasme du globule rouge (Trager, Rudzinska *et al.* 1966). Depuis, des études de microscopie électronique ont permis de

préciser leur morphologie : elles apparaissent sous la forme de structures vésiculaires aplaties, localisées le plus souvent à proximité de la membrane plasmique du globule rouge (Langreth, Jensen *et al.* 1978; Atkinson and Aikawa 1990) (Figure 9). Leur nombre et leur morphologie dépend de la souche de *P. falciparum* étudiée : chez les parasites de la souche 3D7 les structures de Maurer se limitent à des vésicules individuelles ou regroupées en petit nombre, alors que la souche K1 est caractérisée par des structures de Maurer constituées d'un empilement de nombreuses structures vésiculaires évoquant les citernes de l'appareil de Golgi (Figure 9) (Cooke, Lingelbach *et al.* 2004). Bien que les structures de Maurer ne fusionnent jamais avec la membrane du globule rouge, ces deux structures sont physiquement liées : en effet, les structures de Maurer restent liées à la membrane du globule rouge lorsque celle-ci est rompue, que ce soit suite à la libération des mérozoïtes (Martinez, Clavijo *et al.* 1998), ou suite à une lyse artificielle du globule rouge (Blisnick, Morales Betoulle *et al.* 2000). Des structures filamenteuses, que les auteurs identifient comme des filaments du cytosquelette, ont été observées en microscopie électronique entre les structures de Maurer et la membrane du globule rouge (Taraschi, O'Donnell *et al.* 2003) et pourraient être à l'origine de l'association de ces deux structures. La question de la biogenèse des structures de Maurer n'est pas résolue: l'hypothèse d'une formation par une invagination de la membrane du globule rouge est écartée (Atkinson, Aikawa *et al.* 1988), et certains auteurs ont proposé que les structures de Maurer se forment par bourgeonnement à la surface de la vacuole parasitophore (Elford, Cowan *et al.* 1995) (Bannister, Hopkins *et al.* 2000). Ce modèle repose sur la description d'extensions de la membrane de la vacuole parasitophore, qui pourraient s'individualiser pour former les structures de Maurer.

Depuis quelques années, les arguments en faveur d'un rôle des structures de Maurer dans le transport de protéines entre la vacuole parasitophore et la membrane du globule rouge s'accumulent, ce qui a suscité un intérêt grandissant pour l'étude de ces structures.

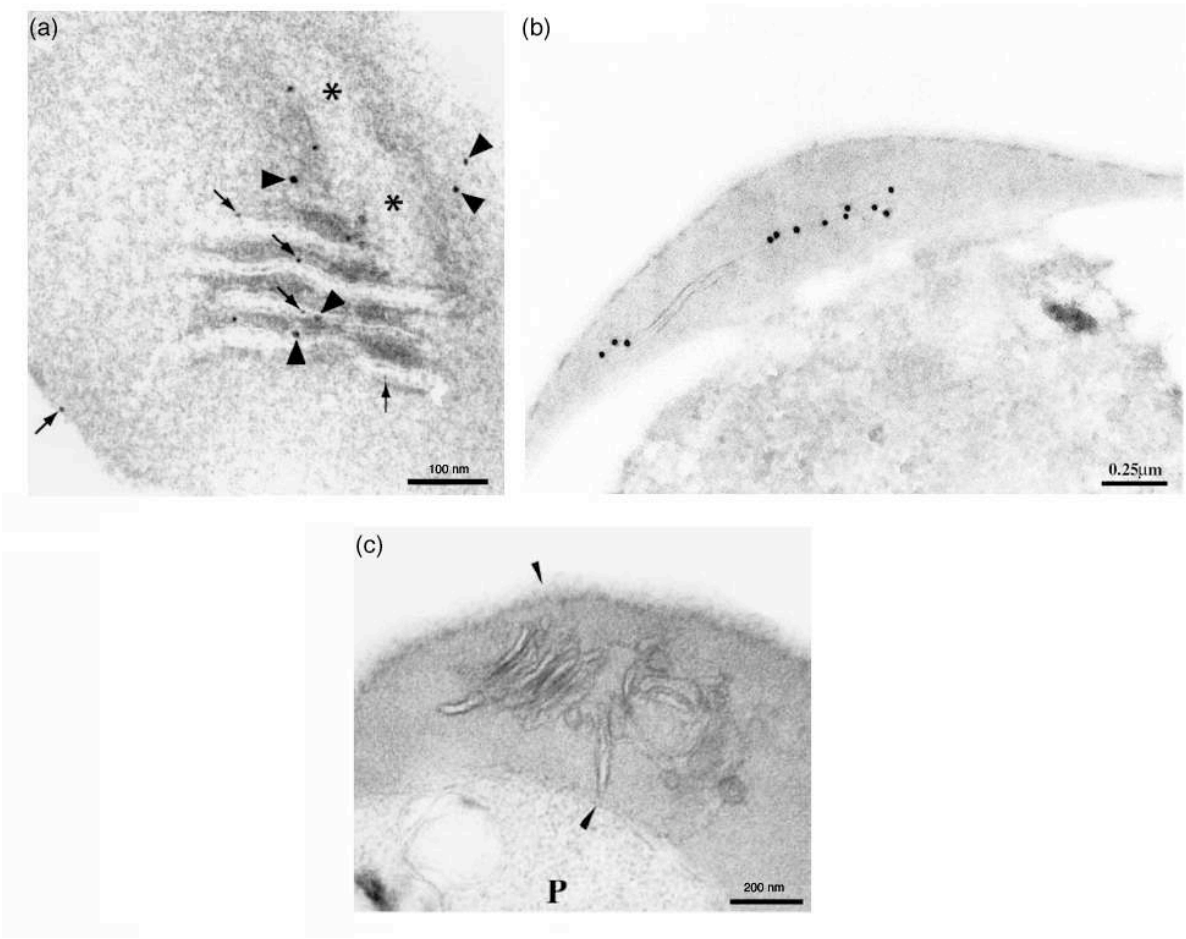


Figure 9 : Morphologie des structures de Maurer observée en microscopie électronique. (a) Les structures de Maurer de la souche HB3 sont organisées en citernes. Le marquage lié à la protéine PfEMP1 est indiqué par des flèches, et le marquage lié à PfSBP1 par des têtes de flèches (Wickert, Wissing *et al*. 2003). (b) Les structures de Maurer de la souche Palo Alto Marburg se présentent sous la forme de vésicules isolées. Le marquage lié à PfSBP1 est indiqué (Blisnick, Morales Betoulle *et al*. 2000). (c) Observation de la continuité entre le TVN, les structures de Maurer, et la membrane de la vacuole parasitophore, chez la souche HB3 ; les têtes de flèches indiquent les points de contact entre le TVN et la membrane de la vacuole parasitophore, et entre le TVN et la membrane de l'érythrocyte (Wickert, Wissing *et al*. 2003).

2-3 Les structures de Maurer sont-elles en continuité avec le TVN?

2-3-1 Les structures de Maurer ont des caractéristiques de vésicules isolées…

Historiquement, les structures de Maurer ont été définies comme des structures membranaires individualisées dans le cytoplasme du globule rouge. Divers travaux ont également suggéré que le fonctionnement des structures de Maurer est indépendant de celui du TVN : en particulier, l'organisation des structures de Maurer ne semble pas affectée par la disparition du TVN, et si les structures de Maurer participent à l'export de protéines, le TVN serait lui

impliqué dans l'import de molécules (Lauer, Rathod *et al.* 1997). Par ailleurs, plusieurs protéines localisées dans les structures de Maurer ont été bien caractérisées, notamment les protéines Pf332 (Hinterberg, Scherf *et al.* 1994) et PfSBP1 (Blisnick, Morales Betoulle *et al.* 2000), et le marquage observé en immunofluorescence pour ces protéines n'est pas ambigu. Il est ponctiforme, ce qui suggère fortement que ces protéines sont circonscrites dans un compartiment donné, qui ressemble à un ensemble de vésicules individuelles réparties dans le cytoplasme du globule rouge. Ces protéines ont servi de marqueur pour la localisation d'autres protéines : les protéines HRPI, PfEMP1 et PfEMP3, pour ne citer qu'elles, colocalisent avec PfSBP1 dans les structures de Maurer, qui apparaissent comme un compartiment nettement circonscrit (Wickham, Rug *et al.* 2001). Par ailleurs, des études de transfection, utilisant une construction qui associe la séquence amino-terminale de PfExp1 à la GFP (Adisa, Rug *et al.* 2003), montrent que la protéine chimérique GFP est adressée dans la vacuole parasitophore, et qu'elle n'est jamais exportée vers des vésicules individualisées dans le cytoplasme du globule rouge. Si la GFP est parfois observée dans la région cytoplasmique du globule rouge, elle reste confinée dans des structures membranaires qui bourgeonnent à partir de la membrane de la vacuole parasitophore, et qui constituent le TVN. Ces résultats sont confirmés par des études classiques de microscopie électronique (Trelka, Schneider *et al.* 2000; Kriek, Tilley *et al.* 2003; Taraschi, O'Donnell *et al.* 2003), qui précisent l'organisation des structures de Maurer en observant des coupes ultrafines. Les études de Kriek et collègues suggèrent même que les structures de Maurer pourraient être organisées en différents domaines, spécialisés dans l'accumulation et l'export de protéines (Kriek, Tilley *et al.* 2003). Ainsi, l'étude de la répartition des protéines par immunofluorescence laisse à penser que les structures de Maurer constituent effectivement un compartiment individualisé au sein du cytoplasme du globule rouge.

En revanche, des études de microscopie réalisées après un marquage simultané des lipides et de certaines protéines, ainsi que des travaux de reconstitution tridimensionnelle à partir de coupes sériées semblent indiquer une autre réalité.

2-3-2 …mais plusieurs arguments suggèrent que les structures de Maurer sont des domaines particuliers du TVN

Dès 1994, Behari et Haldar font des expériences de marquage simultané des lipides et des protéines PfExp1 et p45, localisées dans la vacuole parasitophore et les structures de Maurer respectivement (Behari and Haldar 1994). Leurs travaux démontrent que les deux protéines

sont associées à un réseau continu, émergeant de la membrane de la vacuole parasitophore. Mais PfExp1 et p45 ne colocalisent pas : ainsi, à supposer que les structures de Maurer appartiennent au TVN, elles en constituent des domaines particuliers, qui ont une composition protéique différente. Plusieurs autres travaux de co-marquage de lipides et de protéines aboutiront à la même conclusion (Bozdech, VanWye *et al*. 1998; Haldar, Samuel *et al*. 2001) : le cliché le plus convaincant est présenté en figure 10.

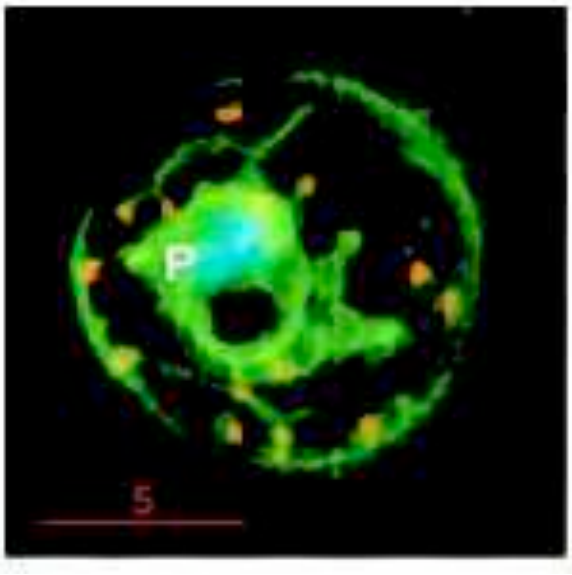


Figure 10 : Les structures de Maurer apparaissent comme des domaines particuliers du TVN.
Un globule rouge parasité a été incubé en présence de BODIPY-ceramide, qui marque les lipides (vert), et d'un anticorps dirigé contre une protéine des structures de Maurer (rouge). Le noyau, coloré avec du Hoechst apparaît en bleu. D'après (Haldar, Samuel *et al*. 2001).

Depuis, des études plus sophistiquées d'analyse informatique de coupes sériées et de reconstitution tridimensionnelle ont confirmé ces résultats. Wickert et collègues ont ainsi pu montrer que les structures dites de Maurer, qui se présentent comme des vésicules individualisées, correspondent en fait à des coupes transversales de structures en citernes, orientées perpendiculairement au plan de coupe (Wickert, Wissing *et al*. 2003). Le TVN et les structures de Maurer constitueraient une unique structure membranaire extrêmement ramifiée, émergeant parfois en plusieurs points de la vacuole parasitophore. Cette structure réaliserait un continuum entre la vacuole parasitophore et la périphérie du cytoplasme du globule rouge. Les travaux de Haeggström et collègues précisent quelle peut être l'organisation des structures de Maurer au sein du TVN : après avoir montré que les protéines de la famille RIFIN transitent par les structures de Maurer et colocalisent avec PfEMP1, ils ont réalisé des expériences de colocalisation entre les deux protéines (Haeggstrom, Kironde *et al*. 2004). Si

elles semblent effectivement être localisées au sein des structures de Maurer, en revanche leur colocalisation n'est pas parfaite : RIFIN est concentrée en périphérie, alors que Pf332 est au centre des structures de Maurer. Ce résultat suggère à première vue que les structures de Maurer sont compartimentées, ce qui confirme les conclusions de Kriek et collègues (Kriek, Tilley *et al.* 2003). Mais en regardant de plus près les clichés de microscopie électronique de Wickert et collègues, il est tentant de supposer que les protéines, au lieu d'être séparées dans des domaines particuliers d'une structure vésiculaire unique comme le décrit Haeggstrom, pourraient être réparties dans différentes vésicules, qui apparaissent ici sous la forme de structures individualisées, probablement suite à un artefact de microscopie.

Les deux modèles que nous venons de présenter ne s'excluent pas forcément : il est probable que les structures de Maurer fassent partie du TVN, mais qu'elles en constituent des domaines distincts. Il existerait alors des mécanismes de tri sélectif entre le TVN et les structures de Maurer permettant de concentrer certaines protéines au sein des structures de Maurer (PfSBP1, PfEMP1) et d'en exclure d'autres (PfExp1). Différents mécanismes, sur lesquels nous allons revenir, sont proposés pour expliquer la formation de compartiments au sein du TVN. Il est également possible que les structures de Maurer soient le plus souvent en continuité avec le TVN, mais qu'elles s'individualisent dans certains cas, en bourgeonnant à partir du TVN. Par ailleurs, les travaux que nous avons décrits utilisent différents clones de *P. falciparum*. Bien que ces structures soient globalement conservées entre différentes souches, voire différentes espèces de *Plasmodium* (Blisnick, Morales Betoulle *et al.* 2000), la comparaison de ces travaux suggère que l'organisation du TVN peut varier d'un isolat parasitaire à l'autre : les structures observées en microscopie électronique sur des parasites de souche HB3 par Wickert sont complexes et forment des empilements dont la morphologie évoque des citernes golgiennes, alors que Kriek et Taraschi décrivent des structures vésiculaires isolées pour les souches A4 et FCR3. Les structures observées paraissent trop différentes pour pouvoir provenir d'un simple biais de sélection des clichés. Or les travaux des uns plaident en faveur de l'hypothèse de structures indépendantes, et ceux des autres en faveur d'un TVN organisé en un continuum. La comparaison entre les différentes études s'avère donc relativement délicate, et la généralisation d'une observation doit être faite avec prudence. Quoi qu'il en soit, la confrontation des différents résultats nous aura convaincus de la nécessité d'étudier des coupes sériées et de l'intérêt des reconstitutions tridimensionnelles.

2-3-3 Comment expliquer et étudier la formation de compartiments au sein du TVN ?

Nous avons déjà mentionné la présence de *rafts*, ces domaines membranaires particuliers enrichis en sphingolipides et en cholestérol, au sein de la membrane de la vacuole parasitophore. Ces *rafts* contiennent à la fois des protéines de la membrane du globule rouge, et des protéines parasitaires : en particulier, PfExp1, protéine de la membrane de la vacuole parasitophore et du TVN, exclue des structures de Maurer, est associée à des DRM (Lauer, VanWye *et al*. 2000). Plusieurs auteurs ont donc proposé que les protéines résidentes du TVN soient associées aux DRM, alors que les protéines exportées vers la membrane ou le cytoplasme du globule rouge n'interagissent pas avec ces domaines (Haldar, Samuel *et al*. 2001; Przyborski, Wickert *et al*. 2003). Des données expérimentales récentes semblent confirmer ce modèle : Hoessli et collègues ont montré que le fragment carboxy-terminal de 19 kDa de MSP-1, possédant un ancrage GPI, est associé à des DRM au sein du TVN avant d'être inséré dans la membrane érythrocytaire, alors que l'extrémité amino-terminale de la protéine reste liée à la membrane de la vacuole parasitophore. L'adressage d'une protéine de surface du mérozoïte à la membrane du globule rouge est surprenant, et suggère que cette protéine pourrait exercer d'autres fonctions au sein du cytoplasme de l'érythrocyte. Ce résultat rejoint ce que nous connaissons du rôle des *rafts* dans le tri et l'adressage de protéines selon la voie du transport basolatéral, et suggère qu'ils participent chez *P. falciparum* à l'adressage des protéines vers des structures érythrocytaires. Toutefois, la protéine PfCDPK1 est à la fois associée à des *rafts* dans le cytoplasme du globule rouge, et présente dans les structures de Maurer (Moskes, Burghaus *et al*. 2004). Il est donc probable que la ségrégation des protéines entre le TVN et les structures de Maurer ne repose par uniquement sur les *rafts* : des protéines localisées à la jonction entre le TVN et les structures de Maurer pourraient effectuer une étape de tri supplémentaire. En effet, les clichés de microscopie électronique montrent que contrairement au TVN, la périphérie des structures de Maurer est dense aux électrons, ce qui suggère que les protéines de surface du TVN et des structures de Maurer sont différentes (Kriek, Tilley *et al*. 2003).

Des études de recouvrement de la fluorescence, ou FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*), réalisées avec des protéines GFP chimères, donnent des informations sur la cinétique des transferts de protéines entre différentes régions cellulaires, et devraient permettre de mieux caractériser les compartiments du TVN, notamment leur taille et leurs interactions éventuelles. Cette technique a permis de mettre en évidence la présence de

compartiments au sein même de la vacuole parasitophore (Adisa, Rug *et al.* 2003), et a été appliquée au cas des structures de Maurer. Les travaux de Wickham et collègues ont montré que la fluorescence de la GFP dans les structures de Maurer est rétablie après un intervalle de temps court (Wickham, Rug *et al.* 2001). Mais les auteurs ont utilisé une construction chimérique fusionnant la GFP aux séquences amino-terminales de HRPI, une protéine cytosolique du globule rouge, et recrutée tardivement aux structures de Maurer (Gormley, Howard *et al.* 1992; Wickham, Rug *et al.* 2001). Le rétablissement de la fluorescence pourrait donc être lié à un recrutement de la fraction soluble de la protéine vers les structures de Maurer, et non pas à un transport latéral entre le TVN et les structures de Maurer. Des études similaires portant sur des protéines intégrales de la membrane des structures de Maurer (par exemple PfSBP1) apporteraient beaucoup d'information sur la question.

3- Les structures de Maurer participent au transport des protéines vers la membrane érythrocytaire

Toutes les protéines transmembranaires du globule rouge étudiées à ce jour transitent par les structures de Maurer avant d'atteindre leur destination finale, en particulier les protéines appartenant aux familles multigéniques PfEMP1, RIFIN et STEVOR (Wickham, Rug *et al.* 2001; Kaviratne, Khan *et al.* 2002; Haeggstrom, Kironde *et al.* 2004). Un certain nombre de protéines solubles, associées à la membrane du globule rouge sont également recrutées au niveau des structures de Maurer : c'est le cas en particulier de HRPI et PfEMP3, qui sont associées à PfEMP1 au niveau des knobs (Waterkeyn, Wickham *et al.* 2000; Wickham, Rug *et al.* 2001). Il est alors tentant de proposer que les structures de Maurer constituent une plate-forme d'assemblage des différentes protéines formant le complexe de cytoadhérence. Mais cela n'est pas démontré, et pour cela, il faudrait préciser comment les protéines sont transportées entre la vacuole parasitophore et les structures de Maurer, et entre les structures de Maurer et la membrane du globule rouge. Deux modèles sont proposés, qui reposent chacun sur une conception différente des structures de Maurer. En effet, le mécanisme de transport est différent selon que les structures de Maurer constituent des vésicules isolées ou un continuum avec le TVN.

3-1 Un transport vésiculaire dans le cytoplasme du globule rouge ?

Outre les observations morphologiques de vésicules isolées dans le cytoplasme du globule rouge, dont nous avons parlé précédemment, de plus en plus d'arguments biochimiques s'accumulent pour indiquer l'existence d'un système de transport vésiculaire classique, d'origine parasitaire, exporté dans le cytoplasme du globule rouge. En effet, des protéines parasitaires homologues à des protéines de la famille COPII, impliquées dans la formation de vésicules destinées à l'appareil de Golgi ont été détectées dans le cytoplasme du globule rouge, associées aux structures de Maurer. Il s'agit de Pfsec23, Pfsec31, et PfSar1 (Albano, Berman *et al.* 1999; Adisa, Albano *et al.* 2001; Wickert, Rohrbach *et al.* 2003). Ces résultats suggèrent l'existence d'un transport vésiculaire dans le cytoplasme du globule rouge infecté par *P. falciparum*, qui met en jeu des vésicules enrobées de protéines de la famille COPII, et fait intervenir les structures de Maurer. La direction de ce transport vésiculaire n'est pas connue, mais la présence de la protéine parasitaire homologue au facteur NSF (PfNSF) au sein des structures de Maurer laisse à penser que celles-ci fusionnent avec des vésicules apportant des protéines cargo (Hayashi, Taniguchi *et al.* 2001). En effet, comme nous l'avons mentionné précédemment, le facteur NSF est impliqué dans la fusion de vésicules et la dissociation du complexe formé par les protéines SNARE. Par ailleurs, d'autres protéines ayant une homologie avec des protéines de l'appareil de Golgi ont été identifiées dans les structures de Maurer. Ainsi, la protéine PfEMP3 a une homologie structurale avec Uso1p, une protéine participant à l'accrochage des vésicules issues du RE à la membrane de l'appareil de Golgi (Waterkeyn, Wickham *et al.* 2000). De même, la protéine soluble 41-2, qui est associée aux structures de Maurer (Nacer, Berry *et al.* 2001), est homologue à la protéine BET3, qui est associée à l'appareil de Golgi chez la levure, et participe au transport entre le RE et l'appareil de Golgi (Jiang, Scarpa *et al.* 1998). Tous ces résultats suggèrent que le parasite exporte dans le cytoplasme de sa cellule hôte les éléments d'une machinerie de transport vésiculaire classique. De plus, ces données biochimiques ont orienté les observations de microscopie électronique : plusieurs auteurs ont décrit des vésicules susceptibles de transporter des protéines entre la vacuole parasitophore et les structures de Maurer, dont la taille (70-100 nm) et le manteau dense aux électrons évoquent des vésicules enrobées de protéines COPII (Trelka, Schneider *et al.* 2000; Taraschi, O'Donnell *et al.* 2003; Bannister, Hopkins *et al.* 2004). Des vésicules plus petites ont été observées entre les structures de Maurer et la membrane du globule rouge (Kriek, Tilley *et al.* 2003). Celles-ci ne ressemblent pas aux vésicules enrobées classiques, car elles sont plus petites (20 nm au lieu de 50 nm), et

sont enrobées d'un manteau moins dense aux électrons. Toutefois, des structures vésiculaires de même taille ont été décrites entre les structures de Maurer et la membrane du globule rouge (Wickert, Wissing *et al.* 2003), que les auteurs identifient comme des vésicules enrobées de protéines de la famille COPII. Cette question pourrait être résolue par des études d'immunomicroscopie électronique, mais quoi qu'il en soit, ces observations plaident en faveur de l'existence d'un transport vésiculaire assurant le transport de protéines entre les structures de Maurer et la membrane du globule rouge. En effet, dans la mesure où aucun événement d'endocytose n'a été décrit au niveau de la membrane érythrocytaire (Haldar, Samuel *et al.* 2001), il est très probable que le transport des protéines est antérograde.

3-2 Un continuum membranaire dans le cytoplasme du globule rouge ?

Nous avons déjà évoqué les arguments suggérant que le TVN forme un continuum entre la membrane de la vacuole parasitophore et les structures de Maurer. Dans cette perspective, il est très probable que seul le transport des protéines entre les structures de Maurer et la membrane du globule rouge soit vésiculaire, le transport des protéines entre la vacuole parasitophore et les structures de Maurer se faisant par transport latéral au sein du TVN (Wickert, Wissing *et al.* 2003). Plusieurs données biochimiques confirment cette hypothèse. En effet, la fraction des protéines de la famille COPII qui est exportée dans le cytoplasme du globule rouge est en général très faible : si 50 % du pool intracellulaire de Sec31 est exporté vers le cytoplasme du globule rouge (Adisa, Albano *et al.* 2001), ce chiffre tombe à 5 % pour les protéines Sar1p et sec23 (Wickert, Rohrbach *et al.* 2003). Il paraît alors difficile d'imaginer que la totalité du transport des protéines entre la vacuole parasitophore et les structures de Maurer met en jeu les protéines de la machinerie COPII si celles-ci ne sont pas très abondantes. La localisation de ces protéines est un argument supplémentaire : celles-ci ne sont pas réparties uniformément dans le cytoplasme du globule rouge, mais restreintes aux structures de Maurer et à la périphérie du globule rouge. Ce résultat plaide d'ailleurs en faveur de l'hypothèse selon laquelle le transport des protéines entre les structures de Maurer et la membrane du globule rouge met en jeu des vésicules. Mais comme nous l'avons dit précédemment, la nature des protéines enrobant ces vésicules est controversée. Un argument supplémentaire en faveur de l'absence de transport vésiculaire est l'absence de microtubules dans le cytoplasme du globule rouge. En effet, dans le système de sécrétion vésiculaire classique, les vésicules sont transportées le long du réseau de microtubules, en association avec la kinésine, qui sert de moteur moléculaire (Lippincott-Schwartz, Roberts *et al.* 2000).

Or, si le parasite semble synthétiser un certain nombre de composants nécessaires au transport de vésicules, ceux-ci ne sont pas exportés dans le cytoplasme du globule rouge (Fowler, Fookes *et al.* 1998), à l'exception toutefois de certains éléments du cytosquelette. En effet, des microfilaments d'actine endogènes ont été observés en périphérie du globule rouge, en particulier au niveau de la jonction entre les structures de Maurer et la membrane du globule rouge (Taylor, Parra *et al.* 1987; Taraschi, O'Donnell *et al.* 2003). Les auteurs ont initialement pensé que ces microfilaments participent à l'arrimage des structures de Maurer à la membrane du globule rouge (Etzion and Perkins 1989), mais ils pourraient également intervenir dans le transport vésiculaire, comme cela a été montré dans d'autres systèmes (Valderrama, Luna *et al.* 2000). Ainsi, tous les éléments semblent réunis pour la mise en place d'un transport vésiculaire dans le cytoplasme du globule rouge, mais qui semble restreint au transport entre les structures de Maurer et la membrane du globule rouge.

La conception des mécanismes de transport de protéines entre la vacuole parasitophore et les structures de Maurer est donc très différente selon que l'on considère que les structures de Maurer sont un compartiment individualisé et physiquement séparé du TVN, ou au contraire qu'elles forment un réseau membranaire en continuité avec le TVN. La question de l'existence d'un transport vésiculaire classique entre la vacuole parasitophore et les structures de Maurer reste controversée, et l'utilisation de différents clones parasitaires ayant des TVN morphologiquement différents en microscopie électronique rend la comparaison des travaux parfois délicate. En revanche, tous les auteurs semblent s'accorder sur l'existence d'un système de transport vésiculaire entre les structures de Maurer et la membrane du globule rouge. Ce dernier est encore mal caractérisé, et leur seule étude morphologique en microscopie électronique ne permet pas de conclure quant à la nature des protéines participant à la formation de ces vésicules.

3-3 Vers une réalité plus complexe

La question du mécanisme du transport des protéines entre la vacuole parasitophore et la membrane du globule rouge ne se réduit pas à la question de savoir si le transport est vésiculaire ou non. En effet, les auteurs ont considéré jusqu'à présent que les protéines transmembranaires sont insérées dans la membrane du RE de façon co-traductionnelle, et qu'elles demeurent ensuite associées à des structures membranaires (vésiculaires ou non), jusqu'à leur insertion dans la membrane du globule rouge. Mais une étude récente des

propriétés de solubilité de PfEMP1 remet en cause ce modèle simple (Papakrivos, Newbold *et al*. 2005). En effet, les auteurs ont montré que la forme intraparasitaire de PfEMP1 est solubilisée par une extraction en carbonate de Sodium, ce qui indique qu'elle est synthétisée sous une forme périphérique de membrane, et non pas transmembranaire. Les auteurs ont ensuite fractionné les globules rouges parasités en une fraction soluble et une fraction particulaire, contenant toutes les structures membranaires de l'érythrocyte. Lorsqu'elle est exportée dans le cytoplasme du globule rouge, PfEMP1 est associée à la fraction particulaire, et elle est entièrement protégée de la dégradation par la trypsine : elle est donc localisée dans la lumière de structures membranaires. En effet, si elle était transmembranaire, une partie de la protéine serait accessible à la digestion par la trypsine. Les propriétés de solubilité de cette forme extracellulaire indiquent qu'elle est toujours périphérique de membrane, interagissant avec les membranes par le biais d'interactions protéine-protéine ; la protéine PfEMP3, dont nous avons évoqué le rôle dans le transport de PfEMP1, pourrait être impliquée dans cette interaction. Ainsi, la protéine PfEMP1 est synthétisée sous une forme périphérique de membrane, elle est transportée à travers le cytoplasme du globule rouge dans la lumière de structures membranaires, et devient transmembranaire au niveau des structures de Maurer (Kriek, Tilley *et al.* 2003).

Jusqu'à présent, les études se sont essentiellement concentrées sur les principaux éléments du transport entre la vacuole parasitophore et la membrane du globule rouge, et n'ont pas encore résolu la question de savoir si ce transport est purement vésiculaire, ou s'il met en jeu des éléments membranaires du TVN. Toutefois, la caractérisation de ce transport doit dépasser ces modèles simples ; en effet, la notion de transport vésiculaire ou le long d'un réseau membranaire peut masquer une certaine diversité parmi les mécanismes de transport, et, comme l'illustre le cas de PfEMP1, cette diversité peut avoir une grande importance, et déterminer notamment la topologie des protéines transmembranaires. Par ailleurs, il ne faut pas perdre de vue le fait que les protéines adressées aux structures de Maurer ne se limitent pas aux protéines transmembranaires : certaines protéines parasitaires cytosoliques du globule rouge sont recrutées au niveau des structures de Maurer après avoir franchi la vacuole parasitophore, et d'autres protéines sont exportées vers le TVN et les structures de Maurer selon une voie d'adressage dépendante des modifications lipidiques et mettant en jeu les *lipid rafts*. Les moyens d'arriver aux structures de Maurer semblent donc très variés, et cela

renforce l'hypothèse selon laquelle les structures de Maurer constituent une plate-forme de recrutement, de tri, et d'assemblage des protéines.

IV Les structures de Maurer, un compartiment sécrétoire original

Depuis que le rôle des structures de Maurer dans le transport des protéines vers la membrane du globule rouge a été établi, ce compartiment a suscité un intérêt grandissant et de nombreuses protéines résidentes des structures de Maurer ont été identifiées. Ces données permettent de mieux caractériser les structures de Maurer : la diversité des protéines identifiées dans les structures de Maurer suggère que ce compartiment exerce des fonctions biologiques variées.

1- Les structures de Maurer constituent le premier exemple d'un appareil de sécrétion exporté par un parasite dans le cytoplasme de sa cellule hôte

La multiplicité des marqueurs golgiens identifiés dans les structures de Maurer tend à confirmer l'hypothèse selon laquelle les structures de Maurer constituent l'équivalent fonctionnel d'un appareil de Golgi exporté hors du parasite. Comme le montrent les travaux de Wickert et collègues, les structures de Maurer observées chez certains clones de *P. falciparum* ont également une organisation structurale caractéristique d'un appareil de Golgi, avec l'apparition de citernes empilées en périphérie du cytoplasme du globule rouge. Nous avons déjà cité de nombreuses protéines golgiennes détectées dans les structures de Maurer : PfSar1p, PfSec31, PfSec24 et PfNSF sont les marqueurs golgiens les plus classiques. Mais d'autres protéines identifiées dans les structures de Maurer ont également une homologie avec des protéines de l'appareil de Golgi. Parmi celles-ci, les mieux caractérisées sont PfEMP3, homologue de Uso1p et 41-2, homologue de Bet3, deux protéines impliquées dans le transport de protéines au niveau de l'appareil de Golgi. Mais récemment, la protéine REX (*Ring EXported protein*), synthétisée et exportée durant les phases précoces du développement érythrocytaire a été détectée dans les structures de Maurer. La fonction de cette protéine n'a pas été caractérisée, mais les analyses bioinformatiques permettent de formuler plusieurs hypothèses. REX possède une homologie avec la protéine Uso1p, avec la tubuline et l'actine,

et avec les motifs *coiled-coil.* Ainsi, REX pourrait participer au transport vésiculaire, à l'ancrage des structures de Maurer à la membrane érythrocytaire, ou intervenir dans des interactions protéine-protéine (Hawthorne, Trenholme *et al.* 2004). L'expression et l'export précoces de cette protéine suggèrent un rôle dans la biogenèse et la mise en place des structures de Maurer.

2- Les protéines intervenant –ou susceptibles d'intervenir- dans la variation antigénique sont associées aux structures de Maurer

Les familles multigéniques *Var Rif* et *Stevor* spécifient respectivement les protéines PfEMP1, RIFIN et STEVOR, susceptibles d'intervenir dans les phénomènes de cytoadhérence -ceci a été démontré pour les gènes Var-, de virulence, de variation antigénique, ou encore d'évasion immune. Ces familles regroupent des gènes localisés au niveau des régions subtélomériques, qui possèdent un fort potentiel de variation résultant de recombinaisons non homologues (Freitas-Junior, Bottius *et al.* 2000). La transcription des gènes de chacune de ces familles est finement régulée, et se fait selon un ordre établi au cours du cycle : *Var* , puis *Rif*, puis *Stevor*. Il est très intéressant de constater qu'au moins une protéine de chacune de ces familles a été identifiée dans les structures de Maurer.

2-1 PfEMP1

Nous avons déjà cité le cas de la protéine PfEMP1, participant au phénomène de cytoadhérence, qui transite par les structures de Maurer avant d'atteindre la membrane plasmique du globule rouge. Des études de cinétique ont montré que l'insertion de PfEMP1 dans la membrane du globule rouge est restreinte à une très courte période, entre 16 et 20 heures après l'invasion (Kriek, Tilley *et al.* 2003). Ë structures de Maurer n'est pas transportée vers la membrane du globule rouge. Une fraction non négligeable de la protéine PfEMP1 est donc résidente des structures de Maurer. Cela pourrait être une conséquence du fait que le transport de PfEMP1 nécessite une ou plusieurs protéines escorte (dont PfEMP3), qui ne sont plus présentes 20 h après l'invasion. Une autre hypothèse proposée est que l'interaction entre PfEMP1 et son ligand active une voie de signalisation qui inhibe le transport de PfEMP1 (Kriek, Tilley *et al.* 2003).

2-2 RIFIN

Les protéines RIFIN sont également des protéines de surface du globule rouge parasité, qui ne participent pas à la cytoadhérence, mais à la formation des rosettes (Fernandez, Hommel *et al.* 1999). Les rosettes consistent en l'association de globules rouges sains autour d'un globule rouge parasité, et constituent des facteurs aggravants souvent associés aux formes sévères de paludisme (Barragan, Spillmann *et al.* 1999). Haeggstrom et collègues ont montré que les protéines variantes PfEMP1 et RIFIN utilisent la même voie de transport entre la vacuole parasitophore et la membrane du globule rouge, et que les deux protéines colocalisent parfaitement. Des études de cinétique permettraient probablement de préciser si RIFIN intervient dans le transport de PfEMP1, et si RIFIN s'accumule dans les structures de Maurer ou est au contraire totalement exportée vers la membrane du globule rouge.

2-3 STEVOR

Le cas des protéines STEVOR est différent, dans la mesure où ces protéines sont résidentes des structures de Maurer, et ne sont pas du tout exportées vers la membrane du globule rouge (Kaviratne, Khan *et al.* 2002). Ceci suggère une autre fonction pour ces protéines : elles parviennent aux structures de Maurer au stade tardif du développement érythrocytaire, à un moment où la membrane de l'érythrocyte est perméable aux anticorps de la circulation sanguine (Hui and Siddiqui 1988). Blythe et collègues ont donc proposé que les protéines STEVOR protègent les protéines des structures de Maurer de la réponse immune de l'hôte. Elles pourraient soit servir de 'bouclier immun', protégeant les protéines des structures de Maurer impliquées dans la libération des mérozoïtes, soit participer elles-mêmes à la libération des mérozoïtes, et leur diversité les protègerait du système immunitaire (Blythe, Surentheran *et al.* 2004).

L'identification dans les structures de Maurer de nombreuses protéines codées par des gènes des familles multigéniques *Var Rif* et *Stevor* souligne la très grande importance fonctionnelle de ce compartiment : ces protéines, essentielles au développement du parasite, à sa virulence, à l'évasion de la réponse immune sont intensivement étudiées, et certaines sont des candidats vaccins. Ainsi, la perspective de bloquer le transport des protéines au niveau des structures de Maurer devient réellement très intéressante, et fait des structures de Maurer une cible thérapeutique potentielle.

3-- Les structures de Maurer contiennent des protéines impliquées dans des processus de signalisation cellulaire

Nous avons évoqué le cas de la protéine PfCDPK1, une protéine kinase dépendante du Calcium exportée dans les structures de Maurer par une voie atypique, mettant en jeu les *lipid rafts* (Moskes, Burghaus *et al.* 2004). Une autre protéine kinase, l glycogène synthase kinase-3 a été identifiée dans les structures de Maurer, où elle est exportée dès le stade trophozoïte jeune (Droucheau, Primot *et al.* 2004). Il est intéressant de constater que cette enzyme, initialement décrite comme une enzyme régulatrice de la synthèse du glycogène, participe en fait à la régulation de beaucoup d'autres fonctions cellulaires : signalisation cellulaire en réponse à l'insuline, à des facteurs de croissance ou à des nutriments, et au contrôle de la division cellulaire et de l'apoptose (Cohen and Frame 2001). Enfin, une sérine thréonine kinase putative (PfEST) pourrait également être localisée dans le TVN et/ou les structures de Maurer (Kun, Hibbs *et al.* 1997). Les protéines kinases participent à de nombreux processus cellulaires, et servent en particulier de relais dans les voies de signalisation. La soixantaine de gènes spécifiant des protéines kinases putatives constitue à l'heure actuelle une piste prometteuse pour la recherche de cibles thérapeutiques (Doerig 2004).

4- Les structures de Maurer contiennent de nombreuses protéines basiques, dont la fonction est inconnue

Deux familles multigéniques spécifiant des protéines riches en résidus basiques et localisées dans les structures de Maurer ont été identifiées chez *P. falciparum* : SEP/etramp, et PfMC-2TM. De façon tout à fait intéressante, d'autres protéines basiques ont également été identifiées au sein de ce compartiment, dont PfSBP1 et MAHRP-1. Toutes ces protéines pourraient établir des interactions protéine-protéine par leurs domaines basiques, et participer ainsi soit à l'ancrage des structures de Maurer à la membrane érythrocytaire, soit à des interactions entre les structures de Maurer et d'autres compartiments.

4-1 La famille SEP/etramp

Les familles multigéniques SEP (*Small Exported Proteins*) et etramp (*Early Transcribed Membrane Proteins*) ont été définies à partir de deux études indépendantes qui avaient pour but de caractériser des gènes transcrits précocement au cours du développement érythrocytaire

(Birago, Albanesi *et al.* 2003; Spielmann, Fergusen *et al.* 2003) ; des gènes communs à ces deux familles ont été secondairement identifiés, conduisant au regroupement de ces familles. Les protéines de la famille SEP/etramp possèdent un peptide signal classique, un domaine transmembranaire, et une région carboxy-terminale chargée riche en résidus basiques. La localisation de diverses protéines SEP/etramp a été étudiée par immunofluorescence : les membres de la famille SEP sont nettement localisés dans les structures de Maurer dès le stade trophozoïte jeune, et jusqu'au début de la schizogonie. Les protéines de la famille etramp étudiées sont détectées essentiellement dans la membrane de la vacuole parasitophore et le TVN. Mais la comparaison de ces résultats est délicate, dans la mesure où la protéine SEP4/etramp4 a été étudiée par les deux équipes, qui observent des marquages relativement différents, l'un caractéristique des structures de Maurer, l'autre du TVN… La différence provient peut-être du stade auquel l'étude est faite : la protéine pourrait être localisée dans les structures de Maurer au stade trophozoïte jeune, et migrer dans le TVN au stade trophozoïte mûr. Les fonctions biologiques de ces protéines ne sont pas connues. Toutefois, parce que des études antérieures ont décrit des exemples de protéines fortement chargées capables d'interagir avec les membranes biologiques, voire de les traverser directement (Schwarze, Hruska *et al.* 2000), Spielman et collègues proposent que les protéines SEP/etramp pourraient participer à l'ancrage de la membrane du TVN à la membrane érythrocytaire, et permettre ainsi l'import de nutriments, de protéines et de cholestérol depuis le milieu extérieur et la membrane du globule rouge (Lauer, Rathod *et al.* 1997; Lauer, VanWye *et al.* 2000). Ces protéines, si elles peuvent effectivement traverser les membranes, pourraient également participer à la mise en place précoce de la machinerie de transport dans le cytoplasme du globule rouge, dans la mesure où leur export vers la vacuole parasitophore ou le cytoplasme du globule rouge ne requiert pas de machinerie de transport particulière (Spielmann, Fergusen *et al.* 2003).

4-2 La famille PfMC-2TM

Les membres de cette famille de protéines 'des structures de Maurer, possédant deux domaines transmembranaires' (MC-2TM) ont été identifiés par des expériences de co-immunoprécipitation réalisées avec un anticorps spécifique d'une protéine des structures de Maurer (Sam-Yellowe, Florens *et al.* 2004). Cette méthode de purification suggère que les protéines identifiées établissent des interactions protéiques au sein des structures de Maurer. Les protéines de cette famille ont une organisation commune : un peptide signal, une région

riche en résidus basiques, et deux domaines transmembranaires carboxy-terminaux, séparés par trois résidus. Mais si la protéine reconnue par l'anticorps utilisé est effectivement située dans les structures de Maurer (Sam-Yellowe, Fujioka *et al.* 2001), d'où le nom donné à la famille multigénique, la localisation des autres membres de la famille n'a pas fait l'objet d'études particulières. Dans la mesure où cette protéine colocalise également avec les lipides du TVN, les auteurs formulent l'hypothèse que les protéines de la famille PfMC-2TM participent au transport de protéines (Sam-Yellowe, Florens *et al.* 2004). De façon tout à fait intéressante, les gènes spécifiant ces protéines sont tous transcrits au stade trophozoïte tardif.

Deux familles spécifiant des protéines transmembranaires, au moins partiellement localisées dans les structures de Maurer ont été identifiées, et ces protéines ont en commun la présence de résidus basiques, susceptibles de participer à des interactions protéine-protéine importantes pour le fonctionnement des structures de Maurer. Les protéines de la famille SEP/etramp sont synthétisées précocement, alors que les protéines PfMC-2TM apparaissent plus tardivement au cours du cycle érythrocytaire. Cela suggère que ces protéines, et les interactions protéiques qu'elles pourraient établir, participent à des processus biologiques différents : les protéines SEP/etramp pourraient participer à la mise en place précoce de la machinerie de transport dans le cytoplasme du globule rouge, alors que les protéines PfMC-2TM seraient davantage impliquées dans le transport des protéines qui transitent par les structures de Maurer avant d'être exportées vers la membrane du globule rouge. Néanmoins, à ce jour, aucune donnée expérimentale ne confirme le rôle des protéines de chacune de ces familles dans le transport de protéines.

4-3 D'autres protéines basiques des structures de Maurer : PfSBP1 et MAHRP-1

PfSBP1 (*skeleton binding protein 1*) et MAHRP-1 (*membrane associated histidine rich protein 1*) sont deux autres protéines transmembranaires des structures de Maurer portant des acides aminés basiques (Blisnick, Morales Betoulle *et al.* 2000; Spycher, Klonis *et al.* 2003). PfSBP1, qui a été caractérisée au laboratoire, interagit par son domaine cytoplasmique avec une protéine érythrocytaire, qui pourrait faire partie du cytosquelette, et ancrer les structures de Maurer à la membrane du globule rouge (Blisnick, Morales Betoulle *et al.* 2000). MAHRP-1 pourrait également établir des interactions électrostatiques soit avec les protéines transportées *via* les structures de Maurer, soit avec des protéines cytoplasmiques, et participer, avec ses domaines riches en histidine, à la formation du manteau dense aux électrons à la

surface des structures de Maurer. Il a aussi été montré que MAHRP-1 se lie à la ferriprotoporphyrine IX, qui est un produit de dégradation de l'hème, et pourrait ainsi protéger les structures de Maurer contre le stress oxydatif lié au métabolisme de l'hème (Spycher, Klonis *et al*. 2003).

5- Une nouvelle famille de structures de Maurer au stade gamétocyte ?

Des structures membranaires ayant une morphologie similaire aux structures de Maurer ont été décrites dans le cytoplasme du globule rouge parasité, au stade gamétocyte (Sinden, Canning *et al*. 1978; Alano and Carter 1990). Mais leur rôle dans le transport de protéines n'a pas été étudié, et aucune protéine de ce compartiment n'est connue. Toutefois, une étude récente montre qu'une forme tronquée de la protéine de surface majeure du gamétocyte, Pfs230, est adressée à ce compartiment intraérythrocytaire, et non pas à la membrane du globule rouge (Eksi, Stump *et al*. 2002). Les auteurs ont montré que les structures de Maurer 'classiques', possédant la protéine marqueur PfSBP1, persistent durant la gamétogenèse. En revanche, ce compartiment, qui ressemble pourtant aux structures de Maurer sur les clichés de microscopie électronique, ne contient pas la protéine PfSBP1. Il pourrait s'agir d'une nouvelle famille de structures de Maurer, mises en place lors de la gamétogenèse, et participant à ce processus de différenciation. Néanmoins, des études menées au laboratoire suggèrent déjà l'existence d'au moins deux types de structures de Maurer chez les stades asexués : en effet, les protéines PfSBP1 et 41-2, localisées dans les structures de Maurer, ne colocalisent pas (Catherine Braun Breton et Denise Mattéi, communication personnelle). Il est donc possible que la nouvelle famille de structures de Maurer dans laquelle la protéine Pfs230 est localisée corresponde en réalité à la famille de structures de Maurer contenant la protéine 41-2 et pas PfSBP1, qui est présente chez les stades asexués.

6- Les structures de Maurer pourraient participer au processus de libération des mérozoïtes

La libération des mérozoïtes hors du globule rouge parasité est un processus central dans le développement érythrocytaire de *P. falciparum*. Elle requiert le franchissement de deux membranes : la membrane de la vacuole parasitophore, et la membrane plasmique du globule rouge (Langreth, Jensen *et al*. 1978). La rupture de ces deux membranes est probablement due

à des activités enzymatiques parasitaires : la libération des mérozoïtes est en effet sensible à des inhibiteurs de protéases (sérine, cystéine et aspartylprotéases) et de phospholipases (Lyon and Haynes 1986; Roggwiller, Blisnick *et al.* 1998; Salmon, Oksman *et al.* 2001). Plusieurs protéases parasitaires susceptibles de participer à la libération des mérozoïtes ont été identifiées. Il s'agit d'enzymes qui dégradent spécifiquement des protéines du cytosquelette érythrocytaire : la plasmepsine II est une aspartylprotéase qui dégrade la spectrine, l'actine et la protéine 4.1, et la falcipaïne 2, une cystéine protéase, clive l'ankyrine et la protéine 4.1 (Bray, Janneh *et al.* 1999; Banerjee, Liu *et al.* 2002; Rosenthal 2004). La digestion protéolytique des éléments du cytosquelette aurait pour effet de déstabiliser fortement la membrane érythrocytaire, et de favoriser sa rupture. Le profil de sensibilité aux inhibiteurs des enzymes impliquées dans chacune de ces deux étapes a pu être établi. En accord avec les travaux de Salmon, Wickham et collègues ont montré que la lyse de la membrane de la vacuole parasitophore est sensible au E64, inhibiteur de sérylprotéases, et que la lyse de la membrane du globule rouge est inhibée par la leupeptine, l'antipaïne, la chymostatine -trois inhibiteurs des cystéine et sérylprotéases de type trypsine- et la pepstatine, inhibiteur des aspartylprotéases (Wickham, Culvenor *et al.* 2003). Ce résultat suggère que des enzymes différentes interviennent dans ces deux étapes. Toutefois, il est probable que la rupture des membranes mette en jeu des cascades d'activation protéolytique : les inhibiteurs cités pourraient interférer aussi bien avec cette cascade d'activation qu'avec l'enzyme effectrice de la rupture.

La mise en place de processus protéolytiques au sein du cytoplasme du globule rouge est un processus qui doit être finement régulé, afin d'éviter une activation intempestive qui conduirait à une dégradation de la cellule. Il est alors tentant de proposer que les structures de Maurer, qui constituent un compartiment membranaire dans le cytoplasme du globule rouge, sont une citerne de stockage des protéases inactives, et participent au transport de ces protéases, après leur activation, vers la membrane érythrocytaire. Cette hypothèse est corroborée par l'étude de l'activité hémolytique de type phospholipase A2 détectée au stade schizonte. En effet, cette activité est associée à la fraction particulaire de schizontes préparée par lyse osmotique ; elle est de plus soluble dans un compartiment membranaire. Ainsi, cette enzyme indispensable à la libération des mérozoïtes pourrait être localisée dans la lumière des structures de Maurer (Roggwiller, Blisnick *et al.* 1998). Comme nous allons le voir dans le chapitre 1, nos travaux suggèrent également que les structures de Maurer établissent des interactions protéiques avec la membrane érythrocytaire, qui pourraient participer au maintien

de l'intégrité de cette membrane au cours du développement du parasite et éviter sa lyse prématurée.

Les structures de Maurer apparaissent finalement comme un compartiment sécrétoire participant au transport de protéines parasitaires vers la membrane du globule rouge, et contenant des protéines caractéristiques d'une machinerie de sécrétion classique. Mais les structures de Maurer ont la grande originalité de présenter ces caractéristiques d'un appareil de sécrétion classique alors qu'elles sont exportées hors du parasite, dans le cytoplasme de la cellule hôte, l'érythrocyte. Elles constituent à ce titre un exemple très intéressant de modification de la cellule hôte par le parasite permettant la mise en place d'un parasitisme actif. Mais la revue générale de l'ensemble des protéines identifiées au sein des structures de Maurer, ou susceptibles d'être associées à ces structures illustre également la très grande diversité des processus cellulaires auxquels les structures de Maurer pourraient participer. La présence des protéines PfEMP1, RIFIN et STEVOR, protéines participant à la variation antigénique souligne la très grande importance fonctionnelle des structures de Maurer et du transport qu'elles permettent entre la vacuole parasitophore et la membrane érythrocytaire. Par ailleurs, ce compartiment n'apparaît pas comme une entité figée et isolée dans le cytoplasme du globule rouge, mais comme une structure qui interagit avec son environnement. D'une part, les structures de Maurer contiennent des protéines impliquées dans les voies de signalisation cellulaire, qui pourraient participer à la transduction de signaux extérieurs ; on peut proposer que le parasite reçoive ce genre de signaux en réponse à la cytoadhérence des globules rouges parasités aux cellules endothéliales ou à l'interaction de la surface érythrocytaire avec un anticorps de l'hôte. D'autre part, de nombreuses protéines transmembranaires riches en résidus basiques sont insérées dans les structures de Maurer ; elles sont susceptibles d'établir un réseau d'interactions protéiques, soit avec des protéines de la lumière des structures de Maurer, soit avec des protéines de la membrane, du squelette sous-membranaire ou du cytoplasme du globule rouge. Ces interactions protéiques peuvent participer à des processus biologiques variés. Enfin, les structures de Maurer sont également susceptibles de participer au processus de libération des mérozoïtes, en amenant à la surface érythrocytaire les activités enzymatiques nécessaires à la lyse membranaire.

L'intérêt de l'étude des structures de Maurer, ce compartiment aux caractéristiques originales, et aux fonctions -avérées ou potentielles- variées, est à présent établi. Nous allons maintenant

détailler les différentes approches que nous avons retenues au cours du travail de thèse, qui a été centré sur ce compartiment.

V- Présentation du sujet de thèse

Le travail de thèse s'inscrit dans une caractérisation moléculaire et fonctionnelle des structures de Maurer selon trois approches. La première approche vise à caractériser l'interaction, mise en évidence au laboratoire, entre PfSBP1, protéine transmembranaire des structures de Maurer, et une protéine érythrocytaire. Il s'agit d'identifier ce partenaire de PfSBP1, de caractériser l'importance fonctionnelle de l'interaction entre ces deux protéines, et de rechercher des facteurs susceptibles de moduler cette interaction. Les deux autres axes de recherche utilisent une approche protéomique pour identifier des protéines des structures de Maurer. L'un d'eux se concentre sur les hydrolases à sérine, et a pour objectif d'identifier de telles activités enzymatiques associées aux structures de Maurer, susceptibles de participer à la libération des mérozoïtes. L'autre vise à identifier, par une analyse protéomique globale, l'ensemble des protéines localisées dans les structures de Maurer, afin de dresser un panorama permettant de préciser l'organisation et le fonctionnement de ces structures.
Les différentes approches évoquées, pour être réalisables, nécessitent une technique efficace de préparation des structures de Maurer. Une telle méthode a été mise au point au laboratoire, et dans la mesure où elle a été utilisée dans chacune des approches que nous avons utilisées, nous allons la détailler dès maintenant.

1- Pré requis : mise au point d'une méthode de préparation des structures de Maurer

La méthode de préparation des structures de Maurer mise au point au laboratoire repose sur le fait que les structures de Maurer sont associées à la membrane érythrocytaire. En effet, l'observation faite par Martinez que les structures de Maurer restent associées à la membrane érythrocytaire après la libération des mérozoïtes suggère que les deux compartiments établissent des interactions fortes (Martinez, Clavijo *et al.* 1998). Blisnick et collègues ont réalisé une lyse osmotique ménagée d'érythrocytes parasités, suivie de lavages afin de récolter la fraction membranaire (Blisnick, Morales Betoulle *et al.* 2000). Ils ont montré que les fantômes de globules rouges ainsi obtenus contiennent effectivement les structures de Maurer

associées à la membrane plasmique du globule rouge et à son squelette sous-membranaire. Il est intéressant de souligner que le TVN de la souche Palo Alto Marburg utilisée ici est dépourvu de citernes, et a une organisation apparemment simple. Les auteurs ont donc considéré que les structures de Maurer constituent des vésicules isolées dans le cytoplasme du globule rouge parasité, comme le suggèrent les clichés de microscopie électronique. Or, selon l'autre point de vue, qui suppose que les structures de Maurer constituent des domaines particuliers du TVN, cette méthode ne permet d'isoler qu'une partie des structures de Maurer. En effet, le TVN est rompu lors de la lyse, et seule la fraction des structures de Maurer associée à la membrane érythrocytaire reste associée aux préparations de fantômes de globules rouges parasités. Quoi qu'il en soit, la détection de PfSBP1, protéine intégrale de la membrane des structures de Maurer, dans les préparations de fantômes de globules rouges parasités montre qu'une partie au moins des structures de Maurer reste associée à la membrane érythrocytaire. C'est donc cette fraction des structures de Maurer que nous avons analysée. La qualité de ces préparations a par ailleurs été validée en immunoempreinte et immunofluorescence : les fantômes de globules rouges ainsi obtenus ne sont pas notoirement contaminés par d'autres structures de l'érythrocyte parasité : cytoplasme du globule rouge, membrane cytoplasme et noyau du parasite…(Tableau 3) Nous avons donc conclu que ces préparations de fantômes de globules rouges parasités constituent un matériel de qualité pour l'analyse protéomique et fonctionnelle des structures de Maurer.

Anticorps utilisés	Localisation subcellulaire	Échantillon	
		Fantômes de globules rouges sains	Fantômes de globules rouges parasités
Bande 3	Membrane plasmique du globule rouge	+	+
Spectrine	Squelette sous-membranaire de l'érythrocyte	+	+
PfSBP1	Structures de Maurer	-	+
SERP	Vacuole parasitophore	-	-
Pf72-HSP70	Cytoplasme du parasite	-	-/+

Tableau 3 : Caractérisation des préparations de fantômes de globules rouges sains et parasités par immunoempreinte et imunofluorescence.
Les préparations de fantômes de globules rouges sains et parasités ont été analysées par immunoempreinte et immunofluorescence. + : protéine détectée par les deux méthodes ; - : protéine détectée par aucune de ces méthodes. La protéine Pf72-HSP70 a été détectée en immunoempreinte au sein de certaines préparations de fantômes seulement, et elle n'a jamais été détectée par immunofluorescence.

2 – Analyse fonctionnelle des structures de Maurer : étude de l'interaction entre la protéine PfSBP1 et une protéine cytoplasmique

Nous avons déjà mentionné la protéine PfSBP1, (*Skeleton Binding Protein*), antérieurement caractérisée au laboratoire, qui est une protéine intégrale de la membrane des structures de Maurer. Sa topologie est connue : son domaine carboxy-terminal est localisé dans le cytoplasme du globule rouge, et son domaine amino-terminal est orienté dans la lumière des structures de Maurer. Des expériences de chromatographie d'affinité, réalisées avec le domaine carboxy-terminal de PfSBP1 exprimé sous la forme d'une protéine recombinante, ont montré que PfSBP1 interagit, par ce domaine, avec une protéine inconnue d'environ 40 kDa. Cette protéine est associée aux préparations de fantômes d'érythrocytes sains, et a des propriétés de solubilité caractéristiques d'une protéine périphérique de membrane (Blisnick, Morales Betoulle *et al*. 2000). Cette protéine inconnue fait donc partie du squelette sous-membranaire érythrocytaire. Il est tentant de proposer que cette interaction participe à l'ancrage des structures de Maurer à la membrane érythrocytaire. Ainsi, cette interaction, si elle est dynamique et variable au cours du cycle érythrocytaire, serait susceptible de moduler le transport des protéines à la sortie des structures de Maurer. L'étude de l'identification de la

protéine interagissant avec le domaine cytoplasmique de PfSBP1, et de la caractérisation des propriétés de cette interaction nous a donc semblé être une piste prometteuse, susceptible d'apporter de nouveaux éléments sur le fonctionnement des structures de Maurer.
Nos travaux ont permis d'identifier LANCL1 comme étant le partenaire cytoplasmique de PfSBP1, de caractériser la cinétique de cette interaction, et de formuler des hypothèses sur son rôle biologique. Ces résultats sont regroupés dans la première partie du chapitre 1, et sous la forme d'un article sous presse. Par ailleurs, nous avons également obtenu des résultats montrant que le domaine amino-terminal de PfSBP1, localisé dans la lumière des structures de Maurer, peut subir des modifications post-traductionnelles, à savoir l'ajout d'un nombre variable de groupements phosphates. Nous montrons que seules les formes phosphorylées de PfSBP1 interagissent avec LANCL1, et nous avons étudié l'importance fonctionnelle de ces phosphorylations. L'ensemble des résultats est regroupé en deuxième partie du premier chapitre, et sous la forme d'un manuscrit soumis à publication.

3 – Pourquoi une approche protéomique ?

Lorsque nous avons débuté ce travail, les structures de Maurer étaient un compartiment cellulaire relativement peu caractérisé : la plupart des informations que nous avons citées dans cette introduction ont en effet été publiées au cours de la thèse. Si les méthodes classiques d'analyse de protéines avaient identifié quelques protéines associées aux structures de Maurer, les études restaient ponctuelles, et ne permettaient pas d'envisager l'analyse à plus grande échelle d'un ensemble représentatif des protéines des structures de Maurer. Or nous voulions entreprendre une telle analyse afin de mieux comprendre la nature, le fonctionnement et les rôles biologiques des structures de Maurer. L'approche protéomique s'est alors imposée, dans la mesure où nous disposions d'une méthode de préparation des structures de Maurer : les préparations de fantômes de globules rouges parasités permettent à la fois de limiter la complexité de l'échantillon étudié, et de l'enrichir en protéines des structures de Maurer. De plus, lorsque nous avons commencé ce travail, les signaux d'adressage aux structures de Maurer n'étaient pas connus, il n'était donc pas possible de cribler *in silico* les gènes codant des protéines susceptibles d'être adressées aux structures de Maurer. La caractérisation du Pexel, le signal qui intervient dans l'export des protéines au-delà de la vacuole parasitophore, est en effet très récente. À l'inverse, nous savions déjà que l'adressage aux structures de Maurer ne nécessitait pas forcément une séquence signal : de fait, aucune des protéines des

structures de Maurer qui étaient alors connues ne comporte de séquence signal, qu'il s'agisse de la protéine Pf332 (Hinterberg, Scherf *et al*. 1994), PfSBP1 (Blisnick, Morales Betoulle *et al*. 2000) ou 41-2 (Nacer, Berry *et al*. 2001). Un autre avantage de l'approche protéomique est de permettre l'identification de protéines hypothétiques. En effet, plus de 65 % des gènes annotés dans le génome de *P. falciparum* spécifient des protéines hypothétiques, dont on ignore si elles sont synthétisées ; ces protéines putatives, n'ayant aucune homologie avec des protéines connues sont donc susceptibles de participer au développement du parasite et à l'établissement des interactions hôte-parasite, et nous intéressent tout particulièrement. L'approche protéomique devrait permettre d'identifier d'emblée certaines des protéines hypothétiques, ce qui prouverait qu'elles sont effectivement synthétisées, et de concentrer les études sur les candidats les plus intéressants.
Nous avons développé deux axes de recherche utilisant des méthodes de protéomique : une étude fonctionnelle, appliquée aux hydrolases à sérine, et une approche globale.

4- Approche protéomique fonctionnelle, appliquée aux hydrolases à sérine

Nous avons entrepris d'étudier spécifiquement les sérine hydrolases associées aux préparations de fantômes de globules rouges parasités, et donc susceptibles d'être localisées dans les structures de Maurer, pour deux raisons. D'une part, comme nous l'avons dit précédemment, la libération des mérozoïtes est sensible aux inhibiteurs de sérine protéase, ce qui suggère que ces enzymes participent à ce processus, soit en tant qu'effecteurs de la lyse membranaire, soit en tant qu'intermédiaires de la voie d'activation de l'effecteur. D'autre part, nous avons détecté des activités de type sérine protéase associées aux préparations de fantômes de globules rouges parasités.
Nous avons utilisé pour cette approche une sonde spécifique du site actif des hydrolases à sérine, qui permet leur identification et leur purification rapide à partir de protéomes complexes. En effet, la FP-biotine consiste en un inhibiteur spécifique des sérine hydrolases, le fluorophosphonate, couplé à la biotine. Le fluorophosphonate interagit spécifiquement et irréversiblement avec les sites catalytiques actifs des sérine hydrolases, et la biotine permet alors la détection et la purification des enzymes ainsi marquées. Nous avons pu mettre en évidence plusieurs activités de type sérine hydrolase associées spécifiquement aux fantômes de globules rouges parasités, et identifier l'une d'entre elles comme étant RhopH2, une protéine précédemment identifiée dans les rhoptries. Nous avons confirmé que RhopH2 est

effectivement exportée du parasite au cours de son développement, et qu'une fraction de cette protéine est associée aux structures de Maurer. L'export d'une protéine des rhoptries vers les structures de Maurer soulève d'intéressantes questions relatives à l'adressage des protéines vers les rhoptries et à la biogenèse de ces organites. Nous avons également cherché à caractériser l'activité protéase associée à cette protéine, et nous tentons actuellement de confirmer l'interaction entre RhopH2 et la FP-biotine. L'ensemble de ces résultats est réuni dans le chapitre 2, et sous la forme d'un manuscrit en préparation.

5 – Analyse protéomique globale des structures de Maurer

L'analyse de la composition protéique globale des préparations de fantômes de globules rouges parasités a pour but d'identifier un maximum de protéines parasitaires associées aux fantômes de globules rouges parasités, qu'elles soient associées aux structures de Maurer à la membrane plasmique ou au squelette sous-membranaire du globule rouge. Cette analyse a été réalisée après un marquage métabolique à la lysine deutérée (LysD4), qui permet de distinguer efficacement en spectrométrie de masse les protéines érythrocytaires des protéines parasitaires. Notre analyse a donc été spécifiquement restreinte aux protéines parasitaires, ce qui a permis de réduire à nouveau la complexité de l'échantillon, et a conduit à l'identification de près de 50 protéines parasitaires différentes présentes dans ces échantillons. Parmi celles-ci on note en particulier PfSBP1, RhopH2, ainsi que plusieurs enzymes protéases et kinases et plusieurs protéines de rhoptries. Nous avons entrepris de préciser la localisation intracellulaire de six d'entre elles. Nous avons pu confirmer leur association aux structures de Maurer, et préciser leur topologie. Ces expériences constituent une première validation de l'approche protéomique globale après marquage métabolique appliquée à *P. falciparum*, et ouvrent la porte à de nouvelles analyses. Par ailleurs, le grand nombre de protéines identifiées permet d'établir un panorama des protéines associées aux préparations de fantômes de globules rouges parasités, et de proposer des hypothèses quant aux fonctions potentielles exercées par les structures de Maurer. Nos résultats sont regroupés dans le chapitre 3, et sous la forme d'un article, actuellement sous presse.

Chapitre 1 : Etude fonctionnelle de PfSBP1, protéine transmembranaire des structures de Maurer

La protéine PfSBP1 est une protéine transmembranaire des structures de Maurer, antérieurement caractérisée au laboratoire (Blisnick, Morales Betoulle *et al*. 2000). Elle a été identifiée par des expériences de criblage d'une banque d'expression d'ADN complémentaire de *P. falciparum* avec un sérum de singe hyperimmun. Il s'agit d'une protéine de 338 acides aminés, dont la masse moléculaire apparente est de 48 kDa ; elle possède un domaine transmembranaire entre les résidus 217 et 238, mais elle est dépourvue de peptide signal. Son domaine amino-terminal est orienté vers la lumière des structures de Maurer et son domaine carboxy-terminal est cytoplasmique. Cette protéine est synthétisée très tôt après l'invasion et elle persiste durant tout le cycle érythrocytaire. Elle est rapidement exportée vers les structures de Maurer après sa synthèse et ne s'accumule pas dans le cytoplasme du parasite (Blisnick, Morales Betoulle *et al*. 2000). Elle constitue à ce titre une protéine marqueur des structures de Maurer.

Nos études ont porté sur la fonction de cette protéine. Nous avons identifié le partenaire érythrocytaire de PfSBP1 et montré que PfSBP1 est l'objet de modifications post-traductionnelles qui modulent cette interaction. Nous avons montré que ces modifications post-traductionnelles consistent en des événements de phosphorylation, que nous avons caractérisés, et dont nous avons cherché à préciser l'importance fonctionnelle.

I- Etude de l'interaction entre PfSBP1, protéine transmembranaire des structures de Maurer, et son partenaire érythrocytaire LANCL1

Introduction à l'article 1

La protéine PfSBP1 est la première protéine résidente des structures de Maurer qui ait été caractérisée. Cette protéine a été considérée comme un candidat de choix pour participer à l'association étroite entre les structures de Maurer et la membrane érythrocytaire, d'une part parce qu'elle est transmembranaire, et d'autre part parce que son domaine carboxy-terminal porte des répétitions de la séquence basique QNPQ, susceptible d'être impliquée dans des interactions protéines-protéines. Les structures de Maurer restent en effet liées à la membrane érythrocytaire lorsque celle-ci est rompue. La rupture peut être naturelle, due à la libération des mérozoïtes, ou induite par une lyse osmotique ménagée. Ces observations ont conduit les auteurs à étudier les interactions protéiques établies au niveau du domaine cytoplasmique (domaine B28) de PfSBP1. Des expériences de chromatographie d'affinité, utilisant le domaine B28 de PfSBP1, exprimé sous la forme d'une protéine recombinante, n'ont pas mis en évidence de partenaire parasitaire, mais ont montré que PfSBP1 interagit avec une protéine érythrocytaire périphérique de membrane, non identifiée, de 35 kDa environ, qui est associée aux préparations de fantômes d'érythrocytes sains (Blisnick, Morales Betoulle *et al.* 2000). Les auteurs ont émis l'hypothèse que cette protéine, en raison de ses caractéristiques de solubilité, fait partie du cytosquelette sous-membranaire érythrocytaire, et c'est à partir de cette hypothèse que le nom 'Skeleton Binding Protein 1' a été choisi.

Nos travaux se sont inscrits dans la continuation logique de cette étude : nous avions pour objectif d'identifier le partenaire érythrocytaire de PfSBP1 et de préciser le rôle biologique de cette interaction. Nous avons également été amenés à nous interroger sur les modalités et la cinétique de cette interaction. Nous avons dans un premier temps purifié le ligand érythrocytaire de PfSBP1, en reproduisant les expériences de chromatographie d'affinité décrites précédemment, et nous avons pu l'identifier par spectrométrie de masse. Il s'agit de la protéine humaine LANCL1 (*lantibiotic synthetase component C like protein*), une protéine périphérique de membrane de 40 kDa. Les logiciels de prédiction de structure tridimensionnelle identifient dans la séquence de cette protéine sept domaines hydrophobes

comme étant des domaines transmembranaires (Mayer, Breuss *et al.* 1998). Mais contrairement à ces prédictions, la protéine LANCL1 s'est avérée être soluble dans le cytoplasme du globule rouge, et plus ou moins fortement associée à une protéine de la membrane plasmique selon les conditions de salinité (Bauer, Mayer *et al.* 2000). La liaison entre LANCL1 et PfSBP1 met donc probablement en jeu les boucles hydrophiles qui séparent chacun des domaines hydrophobes, dont la longueur varie de 9 à 41 résidus, et nous avons cherché à caractériser lesquelles de ces boucles sont requises pour cette interaction. Nous avons également étudié la dynamique de cette interaction : de façon tout à fait intéressante, nous avons montré que la protéine LANCL1 n'est pas associée à PfSBP1 dès la formation des structures de Maurer, mais est recrutée au niveau des structures de Maurer aux stades tardifs du développement du parasite. Or les structures de Maurer sont associées à la membrane érythrocytaire dès leur formation. L'interaction entre LANCL1 et PfSBP1 ne peut donc à elle seule assurer cette liaison et participe probablement à d'autres processus biologiques.

Nos résultats sont regroupés dans un article actuellement sous presse dans *Molecular and Biochemical Parasitology*.

Article 1 : LANCL1, an erythrocyte protein recruited to the Maurer's clefts during *Plasmodium falciparum* development.

DTD 5
ARTICLE IN PRESS

Available online at www.sciencedirect.com
SCIENCE DIRECT®

Molecular & Biochemical Parasitology xxx (2005) xxx–xxx

MOLECULAR & BIOCHEMICAL PARASITOLOGY

LANCL1, an erythrocyte protein recruited to the Maurer's clefts during *Plasmodium falciparum* development

Thierry Blisnick [a], Laetitia Vincensini [a], Jean Christophe Barale [a, c], Abdelkader Namane [b], Catherine Braun Breton [a, d, *]

[a] *Unité de Biologie des Interactions Hôte-Parasite, CNRS URA 2581, France*
[b] *Génopole/Plate-forme de Protéomique, France*
[c] *Unité d'Immunophysiopathologie Infectieuse, CNRS URA 1961, Institut Pasteur, 25–28 Rue du Dr Roux 75015 Paris, France*
[d] *UMR 5539 CNRS-Université Montpellier 2, Place Eugène Bataillon 34095 Montpellier Cedex 5, France*

Received 13 July 2004; received in revised form 11 November 2004; accepted 18 January 2005

Abstract

As the malarial parasite *Plasmodium falciparum* develops inside the erythrocyte, parasite-derived membrane structures, referred to as Maurer's clefts, play an important role in parasite development by delivering parasite proteins to the host cell surface, and participating in the assembly of the cytoadherence complex, essential for the pathogenesis of cerebral malaria. PfSBP1 is an integral membrane protein of the clefts, interacting with an erythrocyte cytosolic protein, identified here as the human Lantibiotic synthetase component C-like protein LANCL1. LANCL1 is specifically recruited to the surface of Maurer's clefts in *P. falciparum* mature blood stages. We propose that the interaction between PfSBP1 and LANCL1 is central for late steps of the parasite development to prevent premature rupture of the red blood cell membrane.
© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Malaria parasite; Erythrocyte membrane; Maurer's clefts; Host–parasite interaction

1. Introduction

As the malaria parasite develops inside the erythrocyte, parasite proteins are delivered to the host cell membrane to achieve the needs of its growth and survival. A novel pathway has evolved in *Plasmodium falciparum* malaria parasites for these important biological functions, corresponding to a secretory compartment transposed into the host cell cytoplasm and referred to as Maurer's clefts [1–4]. Indeed, components of typical trafficking pathways such as proteins of the COPII complex (PfSAR1 and PfSec31) and homologue of the *N*-ethylmaleimide sensitive factor (PfNSF) interacting with receptors of the SNARE family, are associated with Maurer's clefts [3,5–7]. Importantly, the Maurer's clefts participate in the assembly of the cytoadherence complex underlying the pathogenesis of cerebral malaria [3,8–13]. The recent localisation of the small variant antigen STEVOR within the Maurer's clefts also places emphasis on the biological interest of this sub-cellular compartment [14]; indeed it has been proposed that STEVOR is implicated in the protection of the Maurer's clefts against the potential activity of host immunoglobulins that might impair an essential role of this compartment in late schizonts [15]. Moreover, following natural or hypotonic rupture of *P. falciparum*-infected erythrocytes, Maurer's clefts are recovered with the red cell ghosts, suggesting that these structures bind to the erythrocyte plasma membrane [16,17]. This binding may drive the regulated sorting of parasite molecules to the red cell surface, and thus have an important role in parasite development. Our study focuses on the characterisation of molecules likely implicated in such a host–parasite interaction.

In a previous study we validated the use of limited osmotic lysis for the preparation of Maurer's clefts bound to

Abbreviations: IRBC, *P. falciparum*-infected red blood cell; LANCL1, lantibiotic synthetase component C-like protein

* Corresponding author. Tel.: +33 4 67 14 33 81; fax: +33 4 67 14 42 86.
E-mail address: cbb@univ-montp2.fr (C. Braun Breton).

0166-6851/$ – see front matter © 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.molbiopara.2005.01.013

the red cell plasma membrane and submembrane skeleton (referred to as red cell ghosts) [17]. We have thus characterised PfSBP1, a *P. falciparum* protein integral of the Maurer's clefts' membrane, the carboxy-terminal domain of which is located in the erythrocyte cytosol and interacts with an erythrocyte peripheral membrane protein [17]. In this paper, we identify the erythrocytic ligand of PfSBP1 and further characterise this interaction at different steps of the parasite's intra-erythrocytic development.

2. Materials and methods

2.1. Parasite culture and metabolic labelling

P. falciparum 3D7 was grown in vitro under standard culture conditions [18]. The parasite knobby phenotype was maintained by Plasmagel flotation [19]. Synchronisation of the parasite intra-erythrocytic development was obtained following successive rounds of treatment using 0.3 M alanine, 10 mM HEPES pH 7.5 as described [18].

2.2. Preparation of ghosts from uninfected and infected erythrocytes

Uninfected and infected erythrocytes were washed extensively in RPMI 1640 medium and lysed in hypotonic buffer as described [17] or under isotonic conditions by addition of 0.05% saponin in PBS (150 mM NaCl, 5 mM sodium phosphate pH 8) or by freezing/thawing in PBS [20]. The lysates were then separated by centrifugation into a cytosolic fraction and a pellet containing ghosts and free parasites. The ghosts were recovered from the pellet by differential centrifugation and extensive washing with the corresponding buffer and stored as a pellet at −20 °C or processed further for indirect immunofluorescence assays. Extraction of ghost proteins was performed in 1% Triton X100, 1 M NDSB201 (non-detergent sulphobetaine 201), 10 mM Tris pH 7.5 supplemented with 10 μg ml^{-1} leupeptin and pepstatin as described [21].

2.3. Protein immunodetection

Immunoprecipitation assays of 1% Triton X100, 1 M NDSB201 protein extracts were performed as described [18] and the samples analysed by SDS-PAGE. The gels were processed for fluorography [22] and exposed to Kodak Biomax MS films. Immunoblotting assays were performed as described [17]. The PfSBP1-specific sera have been previously validated and were used at a 1/200 dilution for both immunoprecipitation and immunoblot assays [17]. The "H60 Ab" rabbit serum raised against the N-terminus of human LANCL1 was used at a 1/500 dilution [20]. Indirect immunofluorescence assays were performed on 3.7% formaldehyde-fixed and 0.5% Triton X100 permeabilised erythrocytes or resealed ghosts using poly-lysine coated slides [23].

2.4. Production of LANCL1 recombinant proteins

The LANCL1 cDNA was isolated from a human bone marrow cDNA library (Clontech) with linkers added at the extremities of the cDNA fragments, allowing specific asymmetric PCR amplification. Thus a first PCR was performed using the (5′-GCCTTTTTATCCGGGCTTGCTTCCGGCGTCATG-3′) oligonucleotide encompassing the *lancl1* start codon and the 3′-linker oligonucleotide (Clontech). A 1/1000 dilution of the resulting PCR product was submitted to a second round of PCR using an oligonucleotide internal to the LANCL1 coding sequence (5′-G_{440}CTCCAAATGAAATGCTCTATGGGCGAATAGGC$_{471}$-3′) and an oligonucleotide 3′ from the *lancl1* stop codon (5′-G_{1241}AAAGGGTCATGCAGTGAGTTGCAGGTGGCATGC$_{1208}$-3′). The resulting 803 bp amplified cDNA was cloned into the pCR-2.1® vector (TopoTA cloning kit; Invitrogen) according to the manufacturer's instructions and sequenced (Genome Express Company).

In order to express GST-LANCL1 fusion proteins, different fragments were amplified from this 803 bp DNA using primers (Table 1) designed for in frame insertion into the glutathione-*S*-transferase (GST) gene of the pGEX-A vector [17,24].

The GST recombinant proteins and control GST were purified on glutathione-agarose beads as described [25].

2.5. Affinity chromatography

GST-fusion proteins were immobilised on glutathione-agarose beads (1 μg protein per ml of beads) as described [25]. The GST domain was cross-linked to glutathione by a 45 min incubation at room temperature in 9.2 mM BS3 (Bis-sulfosuccinimidyl-suberate; Pierce), 150 mM NaCl, 10 mM

Table 1
Oligonucleotides used for PCR amplification of LANCL1 cDNA fragments

5′*BamH1* oligonucleotide	3′*EcoR1* oligonucleotide	Expressed LANCL1 region
TTTGGGGATCCTGCCTACCTACAGTTAGC	AAAGGAATTCGATGGAGCGCTTGGTTAAGC	Asp_{81}–Ile_{104}
GAAAAGGATCCTCAAAGCCATATTCAGCAG	CATAGAATTCCTGGTACCATTCATACATCA	Pro_{175}–Glu_{212}
TAAGGATCCCAGAGAGGAAAAGTATCTCTG	CCCGAATTCCTTCTTCAGCAACCCATATTG	Arg_{294}–Lys_{317}
TTTGGGGATCCTGCCTACCTACAGTTAGC	CATAGAATTCCTGGTACCATTCATACATCA	Asp_{81}–Glu_{212}
GAAAAGGATCCTCAAAGCCATATTCAGCAG	CCCGAATTCCTTCTTCAGCAACCCATATTG	Pro_{175}–Lys_{317}
TTTGGGGATCCTGCCTACCTACAGTTAGC	CCCGAATTCCTTCTTCAGCAACCCATATTG	Asp_{81}–Lys_{317}
TTTGGGGATCCTGCCTACCTACAGTTAGC	CCTTTCAGAATTCAAATGCAGGGAACCTGG	Asp_{81}–Glu_{398}

KCl, 8 mM Na_2PO_4, 2 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH 7.4, followed by a 10 min incubation with 0.1 M ethanolamine. Unlinked material was eluted by a 10 min incubation in 20 mM reduced glutathione (ICN), 150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8. The cross-linked material was washed and stored in 0,02% sodium azide, 150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8 at 4 °C. For specific binding to cross-linked protein, the beads were washed in 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, and incubated 60 min at room temperature with the adequate extract. Following three washes in 1% Triton X100, 150 mM NaCl, 25 mM Tris–HCl pH 7.5, the bound material was eluted in 2% SDS, 25 mM Tris–HCl pH 7.5. When needed, the eluted material was concentrated by Speed Vac centrifugation following addition of 2% glycerol.

2.6. Mass spectrometry analyses

For in-gel digestion, sample preparation was performed as described [26]. Briefly, the band was excised from the gel, washed, in-gel reduced, *S*-alkylated with iodoacetamide and in-gel digested with bovine trypsin (sequencing grade, Roche Molecular Biochemicals) at 37 °C overnight. Peptides were extracted, dried with SpeedVac and re-solubilised in 8 μl of 0.1% TFA (tri-fluoroacetic acid). ZipTips (Millipore) were used to desalt samples.

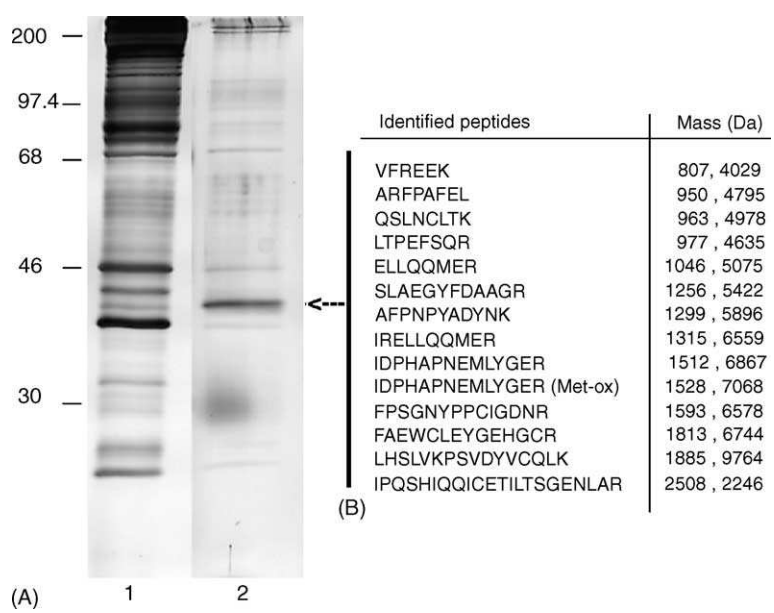
Mass peptide fingerprinting was performed using 0.5 μl of the tryptic digest mixture using alpha cyano 4-hydroxy cinnamic acid (CHCA) (Sigma). The samples were analysed by matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) mass spectrometry on a Voyager DE STR (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, USA) equipped with a nitrogen laser (337 nm). The instrument was operated in the delayed extraction mode and the delay time was 150 ns. Each mass spectrum was an average of 250 laser shots.

For searching on SwissProt database, monoisotopic masses were assigned, using a local copy of the MS-Fit3.2 part of the Protein Prospector package (University of California, Mass Spectrometry Facility, San Francisco). The parameters were set as follows: no restriction was put on the isoelectric point of proteins, 50 ppm were allowed as the maximum mass error, and one incomplete cleavage per peptide was considered.

3. Results

3.1. PfSBP1 interacts with the host LANCL1 protein

We have previously reported that the carboxy-terminal domain of PfSBP1 interacts with a 35–40 kDa erythrocyte protein, whose solubility properties are consistent with its association with the erythrocyte sub-membrane skeleton [17]. In order to further characterise this interaction, the carboxy-terminal domain of PfSBP1, expressed as a glutathione-*S*-transferase fusion protein (GST-B28), was cross-linked to glutathione agarose beads [17]; proteins extracted from uninfected erythrocyte ghosts prepared by hypotonic lysis (Fig. 1A lane 1) were applied to this affinity chromatography column (Section 2). A GST column used as a negative control confirmed that the binding of the 35–40 kDa protein is specific for the B28 domain (not shown) [17]. The material bound to GST-B28 was eluted in 2% SDS, analysed by SDS-PAGE (Fig. 1A lane 2) and concentrated 20 times (Section 2; final glycerol concentration: 40%). Following SDS-PAGE



Identified peptides	Mass (Da)
VFREEK	807, 4029
ARFPAFEL	950 , 4795
QSLNCLTK	963 , 4978
LTPEFSQR	977 , 4635
ELLQQMER	1046 , 5075
SLAEGYFDAAGR	1256 , 5422
AFPNPYADYNK	1299 , 5896
IRELLQQMER	1315 , 6559
IDPHAPNEMLYGER	1512 , 6867
IDPHAPNEMLYGER (Met-ox)	1528 , 7068
FPSGNYPPCIGDNR	1593 , 6578
FAEWCLEYGEHGCR	1813 , 6744
LHSLVKPSVDYVCQLK	1885 , 9764
IPQSHIQQICETILTSGENLAR	2508 , 2246

Fig. 1. Purification and identification of the 35–40 kDa erythrocyte partner of PfSBP1. (A) SDS-PAGE analysis and silver staining of uninfected erythrocyte ghost total extract (lane 1; corresponding to 10^7 erythrocytes) and ghost proteins eluted from a chromatography affinity column with cross-linked GST-B28 (lane 2; corresponding to 2.5×10^7 erythrocytes). The molecular mass markers are indicated (kDa). (B) Sequence and molecular mass of the LANCL1 peptides identified by mass spectrometry of the purified erythrocyte partner of PfSBP1.

analysis of this concentrated eluate and Coomassie staining, a band corresponding to approximately 1 μg of the 35–40 kDa protein was cut from the gel and processed for mass spectrometry analysis as described (Section 2). The mass analysis of the peptides generated by trypsin digestion of the specifically bound 35–40 kDa protein identified the human LANCL1 protein (Lantibiotic synthetase component C-like protein 1). Among 20 peptide masses determined, 3 did not give any hits in data banks, 14 corresponded to a human erythrocyte protein referred to as LANCL1 and 3 to the GST protein, presumably derived from some recombinant GST-B28 molecules not properly cross-linked to the glutathione-agarose beads. The identification of human LANCL1 is reliable because of the number (14/27) of identified peptides and the 35% coverage of the LANCL1 sequence. The binding of LANCL1 to native PfSBP1 was further confirmed by co-immunoprecipitation. Indeed, LANCL1 is specifically detected in immunoprecipitates obtained from a total IRBC extract using antibodies raised against the amino-terminal domain of PfSBP1 while very poorly detected in immunoprecipitates using anti-GST antibodies (not shown).

The LANCL1 protein has been previously reported as a peripheral membrane protein in human erythrocytes and mainly expressed in various cells from the nervous and immune systems [20,27]. Despite seven hydrophobic domains that are highly conserved in eukaryotic homologues of the bacterial LanC enzyme, LANCL1 is not an integral membrane protein; it is essentially soluble in the red cell cytoplasm but is tightly associated to the red cell membrane under hypotonic conditions. The binding partner of LANCL1 in the red cell membrane and the biological role of this protein are currently unknown.

To further characterise the interaction between PfSBP1 and the red cell membrane, the cDNA of LANCL1 was isolated from a human bone marrow cDNA library (Clontech). Various regions of LANCL1 were expressed as GST fusion proteins, purified and cross-linked to glutathione-agarose beads to set up affinity chromatography columns (Section 2). Extracts from infected red cell and ghost preparations were applied to the columns and the bound/eluted proteins were analysed by SDS-PAGE and Western blotting using PfSBP1-specific antibodies. A GST column was used as a negative control. Even though some red cell proteins, including spectrins, were retained on the negative control GST column (as detected by silver staining; not shown), PfSBP1 was repeatedly and specifically eluted from the LANCL1/Asp_{81}–Glu_{212} (Fig. 2 panel 2), LANCL1/Asp_{81}–Lys_{317} (Fig. 2 panel 4) and LANCL1/Asp_{81}–Glu_{398} (Fig. 2 panel 5) columns. PfSBP1 did not bind to LANCL1/Pro_{175}–Lys_{317} (Fig. 2 panel 3) or GST (Fig. 2 panel 1) or individual hydrophilic domains of LANCL1 (not shown).

LANCL1/Asp_{81}–Lys_{317} (Fig. 2 panel 4) and LANCL1/Asp_{81}–Glu_{398} (Fig. 2 panel 5) seem to bind two polypeptides reacting with PfSBP1-specific antibodies. These may represent different forms of PfSBP1. Indeed, using specific antibodies raised against the amino- or carboxy-terminal domains of PfSBP1, 3 forms of PfSBP1 with slightly different apparent molecular masses (thus named PfSBP1-H, PfSBP1-M and PfSBP1-L) are detected in parasite total extracts (Fig. 2 panel 6a). This observation suggests that PfSBP1 undergoes post-translational modifications, potentially related to its transport from the parasite to erythrocyte membrane-bound Maurer's clefts [17]. Moreover, only PfSBP1-H and PfSBP1-M, two phosphorylated forms of PfSBP1 (Blisnick et al. submitted) are recovered from infected erythrocyte ghosts (Fig. 2 panel 6b).

3.2. *LANCL1 is recruited to Maurer's clefts in P. falciparum infected erythrocytes*

Under physiological (isotonic) conditions, the LANCL1 protein is essentially detected in the red cell cytosol while showing tight erythrocyte membrane binding under hypotonic conditions [20]. Because the interaction between LANCL1 and PfSBP1 has been first addressed using hypotonically lysed red blood cells, we have investigated it under more physiological conditions. Un-infected and *P. falciparum*-infected red cells were lysed under two different isotonic conditions: freezing/thawing in PBS or 0.05% saponin in PBS, or by addition of hypotonic buffer. The lysates were then separated by centrifugation into a cytosolic fraction and a pellet (containing ghosts and free parasites) (Section 2); ghosts were recovered from the pellet as described [17] (Section 2). All the ghost preparations from *P. falciparum* infected erythrocytes were shown (by immunofluorescence studies) to be free from contamination

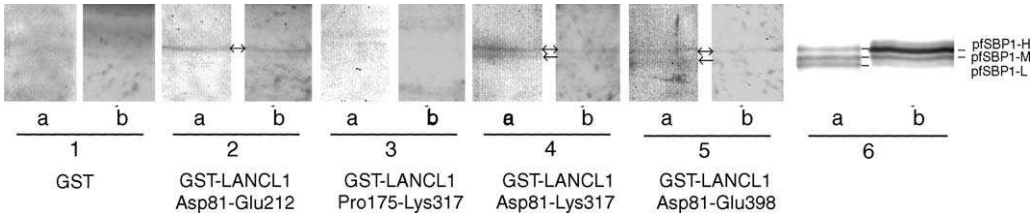


Fig. 2. Binding of PfSBP1 to various polypeptides derived from LANCL1 and expressed as GST fusion proteins. Total (lanes a) and ghost (lanes b) extracts from 10^9 *P. falciparum*-infected erythrocytes were applied to affinity columns prepared with immobilised GST (1), GST–LANCL1/Asp_{81}–Glu_{212} (2), GST–LANCL1/Pro_{175}–Lys_{317} (3), GST–LANCL1/Asp_{81}–Lys_{317} (4) and GST–LANCL1/Asp_{81}–Glu_{398} (5). The bound material was eluted in 2% SDS and analysed by Western blot using a mouse serum raised against the amino-terminal domain of PfSBP1 [17]. Panel 6: total and ghost extracts from *P. falciparum*-infected erythrocytes. The polypeptides corresponding to PfSBP1 are arrowed and named.

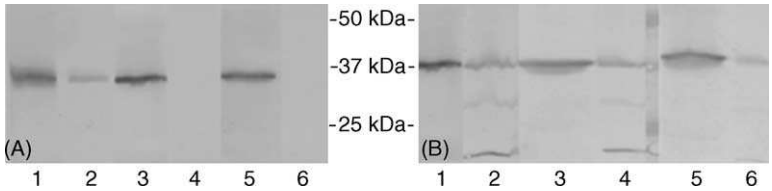


Fig. 3. Western blot analysis of LANCL1 in cytosolic and ghost fractions from uninfected and *P. falciparum*-infected erythrocytes. Uninfected (panel A) and *P. falciparum*-infected (panel B) red cells were lysed by addition of hypotonic buffer (lanes 1 and 2), saponin in PBS (lanes 3 and 4) or by freezing/thawing in PBS (lanes 5 and 6). The lysates were separated into cytosolic (lanes 1, 3 and 5) and ghost (lanes 2, 4 and 6) fractions as described (Section 2). Aliquots of these fractions were analysed by Western blotting using a rabbit serum (H60 Ab) raised against the N-terminus of human LANCL1 (a kind gift of R. Prohaska). Molecular mass markers are indicated.

by parasite cytoplasm and nuclei and, as expected, PfSBP1 was specifically detected in these ghost fractions (data not shown). However, we cannot exclude that ghosts obtained by freezing/thawing in PBS, are contaminated by parasite membranes. Aliquots of the resulting fractions were analysed by immuno-blotting using specific antibodies (Fig. 3).

In non-infected erythrocyte ghosts (Fig. 3A), LANCL1 was detected in the ghost pellet following hypotonic lysis (Fig. 3A lane 2) but essentially recovered in the cytosolic fraction resulting from isotonic lysis (Fig. 3A lanes 3 and 5). These results are concordant with the expected localisation of LANCL1 [20]. Interestingly, LANCL1 is significantly and reproducibly detected in the ghost fraction from infected erythrocytes resulting from hypotonic as well as isotonic lysis (Fig. 3B lanes 2, 4 and 6). These results suggest that the interaction between LANCL1 and PfSBP1 affects the sub-cellular localisation of LANCL1.

The localisation of LANCL1 in uninfected and infected erythrocytes has been further analysed by indirect immunofluorescence studies. In uninfected erythrocytes (Fig. 4a) and early trophozoites (Fig. 4b) a pattern consistent with a cytosolic localisation and spots of aggregation of LANCL1 is observed. In *P. falciparum* schizonts (Fig. 4c), an additional labelling similar to that obtained with PfSBP1-specific antibodies (Fig. 4g and h) is observed, suggesting a Maurer's cleft-like localisation of LANCL1. Indeed additional immunofluorescence experiments show co-localisation of PfSBP1 and LANCL1 in *P. falciparum*-infected erythrocytes and ghosts resulting from their isotonic (freezing/thawing in PBS) and hypotonic lysis (Fig. 5A). Confocal microscopy analyses confirmed this co-localisation (Fig. 5B). Taken together these results are consistent with a recruitment of LANCL1 to Maurer's clefts at a late step of the parasite intra-erythrocytic development.

We have analysed whether the association of Maurer's clefts with the red cell plasma membrane correlates with the recruitment of LANCL1. Immunofluorescence assays were performed on *P. falciparum* early trophozoite and schizont ghosts prepared by freezing/thawing in PBS (Fig. 6). Maurer's clefts are recovered together with red cell ghosts from early and late intra-erythrocytic stages of *P. falciparum*, based on the PfSBP1 labelling. LANCL1 is not detected in early trophozoite ghosts while a pattern characteristic of Maurer's clefts is observed in schizont ghost preparations.

4. Discussion

We have previously proposed that PfSBP1, a parasite trans-membrane protein of the Maurer's clefts, is implicated in the association of these structures to the host cell plasma membrane via its interaction with an erythrocyte peripheral membrane protein [17]. In this paper we reliably identify this erythrocytic ligand of PfSBP1 as human LANCL1.

LANCL1 has similarities with bacterial proteins implicated in the synthesis of lantibiotics [20]. It is noteworthy that these similarities are essentially restricted to the seven hydrophobic domains, while the entire amino acid sequence of human LANCL1 and its murine orthologue align with *Arabidopsis thaliana* and *Drosophila melanogaster* LANC-like proteins (additional data). Consequently eukaryotic LANC-like proteins may have structures resembling those of bacterial LANC enzymes but display different biological activities. The human LANCL1 protein was first identified in red cells and shown to be expressed in a variety of tissues but its biological role is currently unknown [20].

The domains of interaction between PfSBP1 and LANCL1 were further characterised by affinity chromatography using various regions of LANCL1 expressed as GST-recombinant proteins. PfSBP1 was specifically retained to some LANCL1 recombinant proteins. Moreover, among the 3 forms of PfSBP1 (PfSBP1-H, M and L) reproducibly detected in total extracts of *P. falciparum*-infected erythrocytes, only two were recovered in the material bound to LANCL1 and corresponded to the highest and lowest molecular mass forms of PfSBP1 (PfSBP1-H and L). About 20% of total PfSBP1-H and L were retained. Noteworthy, they are the less abundant forms of PfSBP1 in mature trophozoites and schizonts. Interestingly, only PfSBP1-H and M are detected in IRBC ghost preparations and correspond to two phosphorylated forms of PfSBP1 (Blisnick et al. submitted). Consistently, only PfSBP1-H was recovered from ghost preparations of *P. falciparum*-infected erythrocytes on LANCL1/Asp_{81}–Lys_{317} and LANCL1/Asp_{81}–Glu_{398} as well as LANCL1/Asp_{81}–Glu_{212} recombinant proteins. These results suggest that the Asp_{81}–Glu_{212} fragment of LANCL1 is sufficient for PfSBP1 binding and that LANCL1 is essentially binding to the most phosphorylated form of PfSBP1.

While LANCL1/Asp_{81}–Lys_{317} and LANCL1/Asp_{81}–Glu_{398} seem to bind both PfSBP1-H and PfSBP1-L

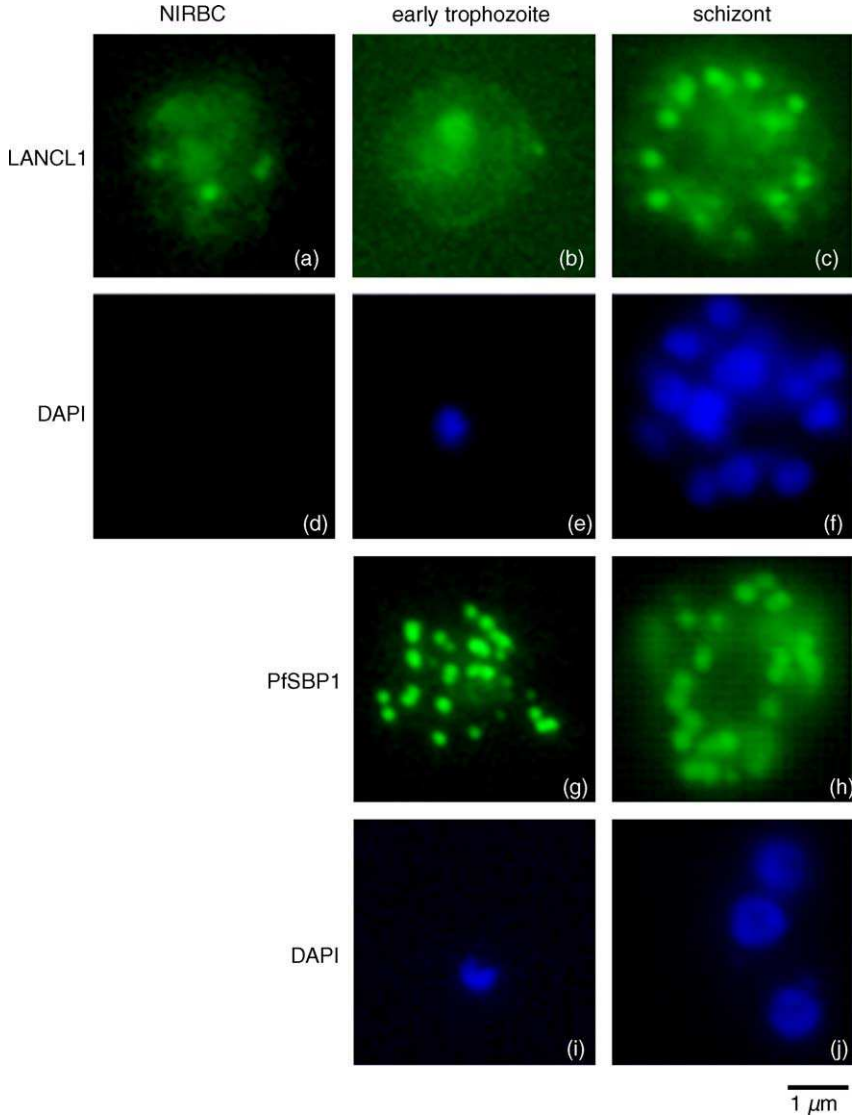


Fig. 4. Immunofluorescence localisation of LANCL1 in uninfected and *P. falciparum*-infected erythrocytes. Un-infected erythrocytes and *P. falciparum*-infected erythrocytes at different stages of the parasite intra-erythrocytic cycle were fixed and permeabilised as described (Section 2). Immunofluorescence analyses were performed using the rabbit H60 LANCL1-specific serum, and a mouse serum raised against the carboxy-terminal domain of PfSBP1 [17]. Non-immune rabbit and mouse sera and anti-GST antibodies were used as negative controls (not shown). DAPI staining of the nuclei assessed the stage of the intra-erythrocytic parasite (in blue).

from an IRBC total extract, the shorter form of recombinant LANCL1, LANCL1/Asp_{81}–Glu_{212}, only binds PfSBP1-H. Because only PfSBP1-H and M are located in the Maurer's clefts and thus potentially interacting with LANCL1 in parasitised erythrocytes, the binding of PfSBP1-L to recombinant LANCL1 proteins may be irrelevant for the biological role of the PfSBP1-LANCL1 interaction.

Despite the seven trans-membrane domains predicted from the LANCL1 amino acid sequence, LANCL1 is detected as a cytosolic protein in uninfected erythrocytes under physiological conditions [20] (Fig. 3). However, the pattern observed in immunofluorescence studies, suggests that the protein might form complexes or aggregates in the red cell cytosol. As expected, LANCL1 has not been recovered in the ghost fraction of isotonically lysed uninfected erythrocytes. On the contrary, LANCL1 is significantly and reproducibly detected in ghost preparations from *P. falciparum*-infected erythrocytes resulting from isotonic lysis of the red cells. This is likely related to the binding of LANCL1 to PfSBP1 that alters the sub-cellular localisation of LANCL1. Indeed, LANCL1-specific antibodies localised the protein to Maurer's cleft-like structures in *P. falciparum* schizonts. Furthermore, LANCL1 co-localised with PfSBP1 in intact schizonts as well as ghosts resulting from their isotonic lysis (Fig. 5). Our results establish that LANCL1 is recruited to the surface of Maurer's clefts via an interaction with the trans-membrane protein PfSBP1 in late intra-erythrocytic stages

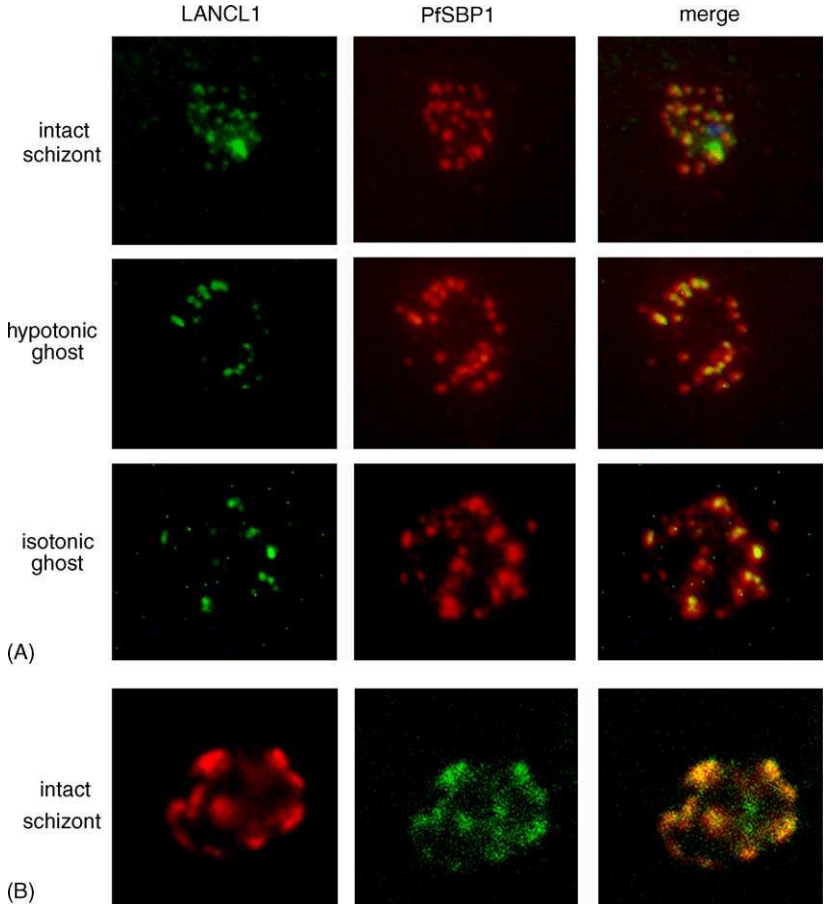


Fig. 5. Co-localisation of PfSBP1 and human LANCL1 to Maurer's clefts. (A) *P. falciparum*-infected red blood cells recovered by Plasmagel flotation (i.e. mature trophozoites and schizonts) and the corresponding ghost preparations resulting from their hypotonic or isotonic (freezing/thawing in PBS) lysis, were analysed by fluorescence (panel A) and confocal (panel B) microscopy following labelling with anti-LANCL1 and anti-PfSBP1 antibodies as indicated. DAPI staining of the nuclei assessed the stage of the intra-erythrocytic parasite.

of *P. falciparum*. Interestingly, the association of LANCL1 with the clefts is restricted to late parasite blood stages while the binding of Maurer's clefts to the red cell membrane is detected since early trophozoites. Thus, this interaction cannot be responsible for the binding of Maurer's clefts to the red cell plasma membrane in early trophozoites. However, proteomic studies of *P. falciparum* IRBC ghosts have recently identified Maurer's cleft transmembrane proteins with structure

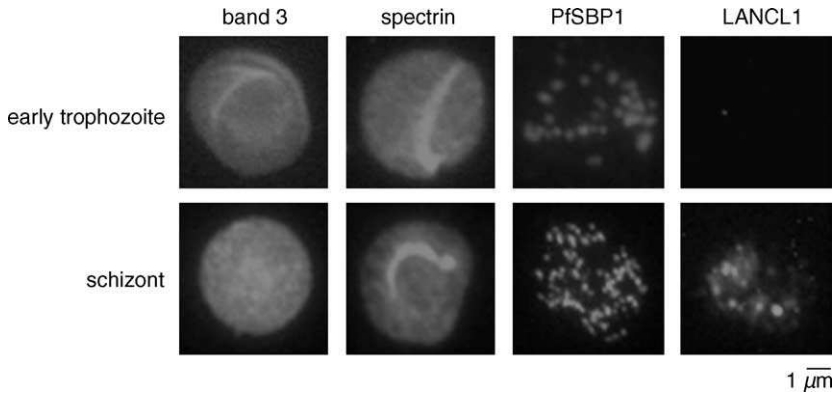


Fig. 6. Immunofluorescence analysis of the association of Maurer's clefts to the red cell plasma membrane. Ghosts were prepared from *P. falciparum*-infected erythrocytes at different stages of the parasite intra-erythrocytic development, under isotonic (freezing/thawing in PBS) conditions. A rabbit serum specific for human spectrin (SIGMA) and a monoclonal antibody specific for human Band 3 (SIGMA) were used as positive controls. DAPI staining of the nuclei assessed the absence of contamination of the ghost preparations by parasite DNA. The presence of Maurer's clefts in the ghost preparations was checked using a PfSBP1 specific serum. LANCL1 was detected using the H60 rabbit serum.

similarities to PfSBP1 that might account for this binding [30].

Our observations are reminiscent of the transient recruitment of the knob protein KAHRP in the red cell cytosol to the surface of Maurer's clefts, a step in the assembly of the cytoadherence complex to the host cell surface [3,8]. However, the association of LANCL1 to Maurer's clefts suggests a separate and important biological relevance. Indeed, it is noteworthy that the SBP1-LANCL1 interaction could be conserved among *Plasmodium* species. This hypothesis is supported by the fact that PfSBP1-specific antibodies label Maurer's cleft-like structures in *P. berghei* and *P. chabaudi* rodent parasites [17] and that LANCL1 is conserved among mammals [27,28]. Moreover, it has been proposed that LANCL1 is bound to an erythrocyte membrane protein under certain physiological conditions [20]. Consequently, its recruitment to PfSBP1 at the surface of Maurer's clefts may tighten the binding of these structures to the red cell membrane and contribute to the altered mechanical properties of the parasitised erythrocytes. Indeed, Glenister et al. proposed that the increased cross-linking of the erythrocyte sub-membrane skeleton resulting from the delivery of parasite proteins to the red cell membrane, prevents the premature rupture of the host cell during parasite development [29]. Thus, the Maurer's clefts might play a dual role for the parasite development, both in the trafficking of parasite proteins to the host cell surface and in the prevention of premature merozoite release. Further identification of the Maurer's cleft contents should help in characterising the parasite's interactions with the host cell membrane and understanding the relevance of this subcellular compartment for the parasite life cycle, revealing new essential metabolic and signalling pathways.

Acknowledgements

We thank T. Ouimet and R. Prohaska for the generous gift of the human bone marrow cDNA library and antibodies to human LANCL1, respectively. We thank M. Guillotte for expert advice regarding immunofluorescence analyses. We are grateful to T. Rabilloud for helpful discussions and to S. Ralph for critical reading of the manuscript. L. Vincensini was supported by a grant from the Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie. This work was supported by the Pasteur Institute, the Centre National de la Recherche Scientifique and the "Programme de Recherche Fondamentale en Microbiologie et Maladies Infectieuses et Parasitaires" from the Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie.

References

[1] Langreth SG, Jensen JB, Reese RT, Trager W. Fine structure of human malaria in vitro. J Protozool 1978;25:443–52.

[2] Hinterberg K, Scherf A, Gysin J, et al. *Plasmodium falciparum*: the Pf332 antigen is secreted from the parasite by a brefeldin A-dependent pathway and is translocated to the erythrocyte membrane via the Maurer's clefts. Exp Parasitol 1994;79:279–91.

[3] Wickham ME, Rug M, Ralph SA, et al. Trafficking and assembly of the cytoadherence complex in *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes. EMBO J 2001;20:5636–49.

[4] Haldar K, Mohandas N, Samuel BU, et al. Protein and lipid trafficking induced in erythrocytes infected by malaria parasites. Cell Microbiol 2002;4:383–95.

[5] Adisa A, Albano FR, Reeder J, Foley M, Tilley L. Evidence for a role for a *Plasmodium falciparum* homologue of Sec31p in the export of proteins to the surface of malaria parasite-infected erythrocytes. J Cell Sci 2001;114:3377–86.

[6] Hayashi M, Taniguchi S, Ishizuka Y, et al. A homologue of *N*-ethylmaleimide-sensitive factor in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* is exported and localized in vesicular structures in the cytoplasm of infected erythrocytes in the brefeldin A-sensitive pathway. J Biol Chem 2001;276:15249–55.

[7] Taraschi TF, O'Donnell M, Martinez S, et al. Generation of an erythrocyte vesicle transport system by *Plasmodium falciparum* malaria parasites. Blood 2003;102:3420–6.

[8] Kriek N, Tilley L, Horrocks P, et al. Characterization of the pathway for transport of the cytoadherence-mediating protein, PfEMP1, to the host cell surface in malaria parasite-infected erythrocytes. Mol Microbiol 2003;50:1215–27.

[9] Pologe LG, Pavlocec A, Shio H, Ravetch JV. Primary structure and subcellular localization of the knob-associated histidine-rich protein of *Plasmodium falciparum*. Proc Natl Acad Sci U S A 1987;84:7139–43.

[10] Triglia T, Stahl HD, Crewther PE, et al. The complete sequence of the gene for the knob-associated histidine-rich protein from *Plasmodium falciparum*. EMBO J 1987;6:1413–9.

[11] Crabb BS, Cooke BM, Reeder JC, et al. Targeted gene disruption shows that knobs enable malaria-infected red cells to cytoadhere under physiological shear stress. Cell 1997;89:287–96.

[12] Pasloske BL, Bruch DI, Van Schravendjik MR, et al. Cloning and characterization of a *Plasmodium falciparum* gene encoding a novel high-molecular weight host membrane-associated protein, PfEMP3. Mol Biochem Parasitol 1993;59:59–72.

[13] Waterkeyn JG, Wickham ME, Davern K, et al. Targeted mutagenesis of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 3 (PfEMP3) disrupts cytoadherence of malaria-infected red blood cells. EMBO J 2000;19:2813–23.

[14] Kaviratne M, Khan SM, Jarra W, Preiser PR. Small variant STEVOR antigen is uniquely located within Maurer's clefts in *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. Eukaryot Cell 2002;1:926–35.

[15] Blythe JE, Surentheran T, Preiser PR. STEVOR–a multifunctional protein? Mol Biochem Parasitol 2004;134:11–5.

[16] Martinez L, Clavjo CA, Winograd E. Identification of peripheral membrane proteins associated with the tubovesicular network of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. Mol Biochem Parasitol 1998;91:273–80.

[17] Blisnick T, Morales Betoulle ME, Barale JC, et al. PfSBP1, a Maurer's cleft *Plasmodium falciparum* protein, is associated with the erythrocyte skeleton. Mol Biochem Parasitol 2000;111:107–21.

[18] Braun-Breton C, Jendoubi M, Brunet E, Perrin L, Scaife J, Pereira da Silva LH. In vivo time course of synthesis and processing of major schizont membrane polypeptides in *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol 1986;20:33–43.

[19] Pasvol G, Wilson RJM, Smalley MJ, Brown J. Separation of viable schizont-infected red blood cells of *Plasmodium falciparum* from human blood. Ann Trop Med Parasitol 1978;72:87–8.

[20] Bauer H, Mayer H, Marchler-Bauer A, Salzer U, Prohaska R. Characterization of p40/GPR69A as a peripheral membrane protein related to the Lantibiotic synthetase component C. Biochem Biophys Res Commun 2000;275:69–74.

[21] Blisnick T, Morales-Betoulle ME, Vuillard L, Rabilloud T, Braun-Breton C. Non-detergent sulphobetaines enhance the recovery of membrane and/or cytoskeleton-associated proteins and active proteases from erythrocytes infected by *Plasmodium falciparum*. Eur J Biochem 1998;252:537–41.

[22] Bonner WM, Laskey RA. A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. Eur J Biochem 1974;46:83–8.

[23] Read M, Sherwin T, Holloway SP, Gull K, Hyde JE. Microtubular organization visualized by immunofluorescence microscopy during erythrocytic schizogony in *Plasmodium falciparum* and investigation of post-translational modifications of parasite tubulin. Parasitology 1993;106:223–32.

[24] Smith DB, Johnson KS. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione *S*-transferase. Gene 1988;6:31–40.

[25] Frangioni JV, Neel BG. Solubilization and purification of enzymatically active glutathione-*S*-transferase (pGEX) fusion proteins. Anal Biochem 1993;210:179–87.

[26] Duche O, Tremoulet F, Namane A, Labadie J, the European Listeria Genome Consortium. A proteomic analysis of the salt stress response of *Listeria monocytogenes*. FEMS Microbiol Lett 2002;215:183–8.

[27] Mayer H, Salzer U, Breuss J, Ziegler S, Marchler-Bauer A, Prohaska R. Isolation, molecular characterization, and tissue-specific expression of a novel putative G protein-coupled receptor. Biochim Biophys Acta 1998;1395:301–8.

[28] Mayer H, Breuss J, Ziegler S, Prohaska R. Molecular characterization and tissue-specific expression of a murine putative G protein-coupled receptor. Biochim Biophys Acta 1998;1399:51–6.

[29] Glenister FK, Coppel RL, Cowman AF, Cooke BM. Contribution of parasite proteins to altered mechanical properties of malaria-infected red blood cells. Blood 2002;99:1060–3.

[30] Vincensini L, Richert S, Blisnick T, et al. Proteomic analysis identifies novel proteins of the Maurer's clefts, a secretory compartment delivering *Plasmodium falciparum* proteins to the surface of its host cell. Mol Cell Proteomics 2005; in press.

Discussion de l'article 1

Les travaux que nous avons décrits ici ont permis de mieux caractériser l'interaction protéique qui avait été mise en évidence au laboratoire lors d'études antérieures (Blisnick, Morales Betoulle *et al*. 2000), entre le domaine cytoplasmique de PfSBP1, protéine transmembranaire des structures de Maurer, et une protéine érythrocytaire.

Nous avons tout d'abord identifié le ligand érythrocytaire de PfSBP1 comme étant la protéine LANCL1 (*lantibiotic synthetase component C like protein*). Cette protéine de 40 kDa, formée de sept domaines hydrophobes séparés par des boucles hydrophiles, doit son nom à sa similarité avec les lantibiotique synthases, des enzymes bactériennes qui appartiennent à des complexes protéiques membranaires impliqués dans la synthèse des lantibiotiques (Bauer, Mayer *et al*. 2000). Ces derniers sont des peptides modifiés contenant de la lanthionine, et ont des propriétés antimicrobiennes. Ce sont des acteurs importants de l'immunité innée, aussi bien chez les bactéries que les insectes ou encore les vertébrés (Sahl and Bierbaum 1998). Depuis, des études de criblage des banques de données ont identifié la protéine LANCL2 chez l'Homme (Mayer, Pongratz *et al*. 2001), ainsi que des protéines homologues à LANCL1 chez d'autres eucaryotes : le rat (Mayer, Bauer *et al*. 2001), *Arabidopsis thaliana* et *Drosophila melanogaster* (Bauer, Mayer *et al*. 2000). Toutes ces protéines ont été regroupées au sein de la famille des protéines *LanC-like*, et leur forte similarité suggère que leur fonction biologique est conservée chez les eucaryotes. Cette fonction est pour l'instant inconnue, mais en raison de leur similarité structurale avec les protéines LanC bactériennes, certains auteurs proposent qu'elles appartiennent à un complexe protéique modifiant les peptides (Bauer, Mayer *et al*. 2000). Elles pourraient ainsi intervenir dans le processus d'immunité innée chez les eucaryotes. Néanmoins, dans la mesure où les similarités sont restreintes aux sept domaines hydrophobes, il est également possible que les protéines *LanC-like* aient une toute autre fonction biologique. Il est intéressant de constater que chez L'Homme les protéines LANCL1 et LANCL2 sont fortement exprimées dans les cellules du système nerveux et des organes génitaux, mais que seule LANCL1 est présente dans les cellules du système immunitaire (Bauer, Mayer *et al*. 2000; Mayer, Pongratz *et al*. 2001).

La protéine LANCL1 a une structure inhabituelle : initialement prédite comme étant une protéine transmembranaire en raison de ses sept domaines hydrophobes (Mayer, Breuss *et al*. 1998), elle s'est avérée être une protéine soluble dans le cytoplasme du globule rouge, plus ou moins fortement associée à sa membrane plasmique selon les conditions de salinité. En effet,

LANCL1 est soluble dans des tampons isotoniques, mais périphérique de membrane suite à une lyse hypotonique des érythrocytes. En outre, elle acquiert une conformation résistante à la dégradation par les protéases en milieu hypotonique (Bauer, Mayer *et al*. 2000). Ces résultats suggèrent que LANCL1, à l'instar de la bande 3, protéine de la membrane érythrocytaire, change de conformation sous l'effet de l'osmolarité (Jenkins and Tanner 1977). Il est donc apparu que la méthode de préparation des fantômes d'érythrocytes parasités par lyse osmotique était susceptible de générer des artefacts lors de l'étude de l'interaction entre PfSBP1 et LANCL1 parce qu'elle induit un changement de conformation de LANCL1. Nous avons alors préparé des fantômes de globules rouges parasités par lyse isotonique, et c'est avec ce matériel que nous avons analysé l'interaction entre PfSBP1 et LANCL1.
Nous nous sommes tout d'abord intéressés aux domaines de LANCL1 interagissant avec PfSBP1 en cherchant à préciser le motif minimal de LANCL1 requis pour son interaction avec PfSBP1 (Figure 11)

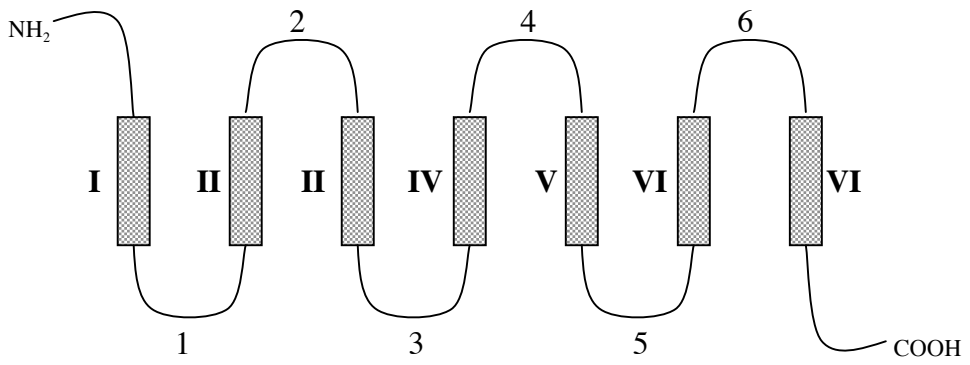


Figure 11 : Organisation de la protéine LANCL1.
Les domaines hydrophobes sont indiqués sous la forme de rectangles et numérotés en chiffres romains. Les boucles hydrophiles sont numérotées en chiffres arabes.

Pour cela, nous avons exprimé différents domaines de LANCL1 sous la forme de protéines recombinantes, que nous avons utilisées pour des expériences de chromatographie d'affinité. Celles-ci ont été réalisées selon une configuration inversée par rapport aux expériences initiales : il s'agit ici de savoir quel(s) domaines de LANCL1 sont suffisants pour retenir la protéine PfSBP1, et non pas de déterminer quelles protéines le domaine cytoplasmique de PfSBP1 peut retenir. Les boucles hydrophiles 1, 3, et 5 de LANCL1 ne retiennent pas la protéine PfSBP1 lorsqu'elles sont exprimées individuellement, ce qui suggère que la structure tridimensionnelle de LANCL1 rapproche ces boucles pour former le motif structural qui

interagit avec PfSBP1. La forme tronquée de LANCL1 contenant les domaines hydrophiles 1, 2 et 3 et les domaines hydrophobes II et III est suffisante pour interagir avec PfSBP1 en chromatographie d'affinité. Elle semble également nécessaire, dans la mesure où la protéine recombinante comportant les boucles 3 et 4 et les domaines IV et V ne retiennent pas PfSBP1. Confirmant cette hypothèse, toutes les autres formes tronquées de LANCL1 contenant les boucles 1, 2 et 3 interagissent avec PfSBP1. Néanmoins l'efficacité de la chromatographie d'affinité est très faible, comme en témoigne l'intensité des immunoempreintes. Cela a limité notre étude des interactions entre PfSBP1 et LANCL1, et nous avons renoncé à des études de mutagenèse des résidus conservés dans les différentes boucles, qui auraient permis de préciser les résidus participant à l'interaction. Nous avons ensuite montré que la localisation subcellulaire de LANCL1 est modifiée lorsque le globule rouge est parasité par *P. falciparum*. En effet, la protéine est détectée par immunoempreinte dans des préparations de fantômes de globules rouges parasités résultant d'une lyse isotonique. Il est tentant de suggérer que la protéine LANCL1 devient périphérique de membrane dans des conditions physiologiques sous l'effet de son interaction avec PfSBP1.

De fait, les études d'immunofluorescence montrent que LANCL1 est effectivement recrutée au niveau des structures de Maurer, mais seulement aux stades tardifs du développement érythrocytaire du parasite. En effet, PfSBP1 et LANCL1 colocalisent lorsque l'on étudie des parasites intacts ou des préparations isotoniques de fantômes de globules rouges parasités au stade schizonte ; en revanche, les mêmes expériences utilisant des parasites au stade trophozoïte ne montrent aucune colocalisation entre les deux protéines. Or les structures de Maurer sont déjà associées à la membrane érythrocytaire au stade trophozoïte jeune, comme l'indique la détection de PfSBP1 au sein de préparations de fantômes de globules rouges parasités à ce stade. Par conséquent, l'interaction entre PfSBP1 et LANCL1 ne peut pas être à l'origine de l'association entre les structures de Maurer et la membrane érythrocytaire, et le fait que cette interaction soit restreinte aux stades tardifs du développement érythrocytaire du parasite suggère qu'elle exerce une autre fonction biologique. Nous envisageons à ce propos deux hypothèses. Comme l'ont suggéré Glenister et collègues à propos des interactions entre des protéines parasitaires et les protéines du squelette sous-membranaire érythrocytaire, l'interaction entre PfSBP1 et LANCL1 pourrait avoir pour effet de stabiliser la membrane érythrocytaire et éviter que la libération des mérozoïtes n'intervienne trop précocement (Glenister, Coppel *et al.* 2002). Alternativement, l'interaction entre PfSBP1 et LANCL1 pourrait servir de signal d'export de protéines contenues dans les structures de Maurer et

impliquées dans la libération des mérozoïtes, comme par exemple des protéases ou phospholipases. Par ailleurs, le fait que LANCL1 soit périphérique de membrane soulève la question de savoir comment elle interagit avec la membrane érythrocytaire. Comme LANCL1 n'est pas associée aux *rafts* de la membrane érythrocytaire, en dépit d'un site potentiel de palmitylation, l'hypothèse de l'existence d'un troisième partenaire protéique est privilégiée (Bauer, Mayer *et al*. 2000). L'identification de ce partenaire protéique, qui associe LANCL1 à la membrane érythrocytaire, ouvrirait probablement de nouvelles perspectives d'études, qui permettraient de préciser le rôle biologique de l'interaction entre PfSBP1 et LANCL1.

II- Etude des modifications post-traductionnlles de PfSBP1 et de leur importance fonctionnelle

Introduction au manuscrit 2

Nous avons montré précédemment que PfSBP1, protéine transmembranaire des structures de Maurer, interagit avec la protéine érythrocytaire LANCL1 au cours des phases tardives du développement érythrocytaire du parasite. Au cours de ces travaux, nous avons également constaté que les anticorps détectent en immunoempreinte trois formes de la protéine PfSBP1, de masses moléculaires légèrement différentes, et que nous désignons sous le nom de PfSBP1-H, M et L. Cette observation suggère que PfSBP1 est l'objet de modifications post-traductionnelles. Or, parmi les formes PfSBP1-H et M, qui sont celles exportées dans les structures de Maurer, seule PfSBP1-H interagit avec LANCL1. La forme de plus faible masse moléculaire de PfSBP1 n'est par contre pas détectée dans les structures de Maurer. Nous avons donc considéré que seule l'interaction entre PfSBP-H et LANCL1 reflète les conditions physiologiques. Ainsi, les modifications post-traductionnelles de PfSBP1 moduleraient son interaction avec LANCL1. L'étape suivante de nos travaux a donc été de caractériser les modifications post-traductionnelles de PfSBP1 et d'étudier leur importance fonctionnelle.

L'ajout de modifications post-traductionnelles sur une protéine peut être définitif, c'est notamment le cas des glycosylations, puisque les groupements glucidiques ne sont généralement plus modifiés après la sortie de la protéine hors de l'appareil de Golgi. En revanche, les modifications lipidiques, dont les ancrages GPI en particulier, sont susceptibles

d'être clivées par des enzymes spécifiques, ce qui a pour conséquence de solubiliser la protéine. C'est notamment le cas de la protéase Pfgp76, qui ne devient active que lorsqu'elle a été solubilisée par clivage de son ancre GPI (Braun-Breton, Rosenberry *et al.* 1988). D'autres modifications post-traductionnelles sont encore beaucoup plus labiles, et peuvent être ajoutées et enlevées plusieurs fois sur une protéine donnée avant sa dégradation. C'est en particulier le cas des événements de phosphorylation, qui consistent en l'ajout d'un groupement phosphoryle sur un résidu sérine, thréonine, ou tyrosine. L'activité des enzymes kinases et phosphorylases, qui catalysent l'ajout et l'hydrolyse d'un groupement phosphate, est très finement contrôlée. L'ajout d'un groupement phosphoryle sur une protéine peut modifier radicalement sa conformation, sa stabilité, sa localisation subcellulaire, ses capacités d'interaction avec d'autres protéines, et augmenter ou diminuer son activité s'il s'agit d'une enzyme. De fait, les phosphorylations participent à des processus cellulaires très variés : contrôle des voies métaboliques et de l'entrée en division cellulaire, transduction d'un signal externe reçu par la cellule, contraction musculaire…

Ainsi, parce que les modifications post-traductionnelles de PfSBP1 semblent moduler d'une manière globale les propriétés de cette protéine, aussi bien en termes de transport intracellulaire que d'interaction avec d'autres protéines, nous avons poursuivi nos travaux en privilégiant l'hypothèse selon laquelle la protéine PfSBP1 est phosphorylée. Nos travaux ont effectivement permis de valider cette hypothèse. Nous avons alors cherché à préciser lequel des domaines de la protéine, cytoplasmique ou luménal des structures de Maurer, est concerné par ces phosphorylations. De façon tout à fait intéressante, nous montrons qu'il s'agit du domaine amino-terminal, qui est localisé dans les structures de Maurer. Nous nous sommes également interrogés sur la nature de la phosphatase qui module cette phosphorylation et avons identifié dans le domaine amino-terminal de PfSBP1 un motif d'interaction avec une phosphatase de type PP1. Ce résultat nous a alors conduits à étudier les protéines phosphatases de type PP1 au sein du globule rouge parasité par *P. falciparum*, en distinguant la protéine endogène de l'enzyme parasitaire, et à étudier leur localisation. Finalement, l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de cette enzyme nous a permis d'appréhender son importance fonctionnelle.

Les travaux que nous décrivons ici sont regroupés dans un manuscrit actuellement soumis à *Cellular Microbiology*.

Manuscrit 2 : PP1 phosphatase, a *Plasmodium falciparum* essential enzyme, is exported to the host cell and implicated in the release of infectious merozoites.

PP1 phosphatase, a *Plasmodium falciparum* essential enzyme, is exported to the host cell and implicated in the release of infectious merozoites.

Thierry BLISNICK[1,2], Laetitia VINCENSINI[1], Gamou FALL[3] and Catherine BRAUN BRETON[1, 3]*.

[1] Unité de Biologie des Interactions Hôte-Parasite, CNRS URA 2581, [2] Laboratoire des Yersinia Institut Pasteur, 25-28 Rue du Dr Roux 75015 Paris, France, [3]UMR 5539 CNRS-Université Montpellier 2 Place Eugène Bataillon 34095 Montpellier Cedex 5, France.

* to whom correspondence should be addressed. Tel: (33) 4 67 14 33 81; Fax: (33) 4 67 14 42 86; E-mail: cbb@univ-montp2.fr

Running title: Malarial merozoite release depends on PP1 phosphatase

Key words: malaria parasite, erythrocyte membrane, type 1 protein phosphatase, Maurer's clefts, invasion, phosphoproteins

Summary

The malarial parasite *P. falciparum* transposes a Golgi-like compartment, referred to as Maurer's clefts, into the cytoplasm of its host cell, the erythrocyte, and delivering parasite molecules to the host cell surface. We report here a novel role of the Maurer's clefts implicating a parasite PP1 type phosphatase and related to the phosphorylation status of PfSBP1, a trans-membrane protein of the clefts interacting with the host cell membrane *via* its carboxy-terminal domain. Based on co-immunoprecipitation and inhibition studies, we show that the parasite PP1 type phosphatase modulates the phosphorylation status of the amino-terminal domain of PfSBP1 in the lumen of Maurer's clefts. Importantly, the addition of a PP1 inhibitor, calyculin A, to late schizonts results in the unique hyperphosphorylation of PfSBP1 and prevents parasite release from the host cell. Taken together our results show that the Maurer's clefts are implicated in the release of merozoites, the invasive blood stage of the parasite. Moreover, the parasite PP1 phosphatase is the first enzyme essential for the parasite development detected in the Maurer's clefts.

Abbreviations :

RBC: non infected red blood cell; IRBC, *P. falciparum*-infected red blood cell; NDSB201: non detergent sulphobetaine 201; PP1, protein phosphatase 1; mAb monoclonal antibody; IC50, 50% inhibitory concentration.

Introduction

Plasmodium falciparum is a protozoan parasite of considerable impact on public health, the control of which is compromised because of the propagation of insecticide resistant *Anopheles* mosquitoes and drug resistant parasites. Inside its human host, the parasite multiplies in the liver and the blood, the blood forms of the parasite being responsible for the malaria-associated morbidity and mortality.

Following invasion by merozoites, the *Plasmodium*-infected red blood cells undergo structural and morphological changes that play essential roles for the efficiency of parasitism by *Plasmodium*. The adhesive properties of *P. falciparum*-infected erythrocytes allow these cells to escape host innate immune defences as well as to modulate the host acquired immune response and are strongly correlated to severe disease [Flick and Chen 2004; Beeson and Brown 2002; Heddini *et al.* 2001]. It has been shown recently that the assembly and trafficking to the red cell membrane of the cytoadherence complex involve Maurer's clefts, a Golgi like secretory compartment transposed by *Plasmodium falciparum* into the cytoplasm of its host cell [Albano *et al.* 1999; Adisa *et al.* 2001; Hayashi *et al.* 2001; Wickham *et al.* 2001; Kriek *et al.* 2003; Wickert *et al.* 2003]. Indeed, Maurer's clefts play an important role for the parasite development by delivering parasite proteins to the red cell membrane [Wickham *et al.* 2001; Kriek *et al.* 2003; Hinterberg *et al.* 1994; Haldar *et al.* 2002]. Maurer's clefts may also be implicated in late steps of the intra- erythrocytic development of the parasite that leads to the release of infectious merozoites, since proteins, such as members of the parasite STEVOR multigene family and the erythrocyte protein LANCL1, are specifically addressed or recruited to the Maurer's clefts in late erythrocytic stages [Kaviratne *et al.* 2002; Blisnick *et al.* 2005].

The Maurer's clefts are bound to the erythrocyte submembrane skeleton and plasma membrane early after invasion and throughout the parasite intra-erythrocytic development

[Martinez *et al*. 1998; Blisnick *et al*. 2000; Blisnick *et al*. 2005]. This property results in their recovery together with erythrocyte ghosts following natural or induced rupture of infected erythrocytes [Martinez *et al*. 1998; Blisnick *et al*. 2000]. The interaction between Maurer's clefts and the host cell membrane likely involves several protein complexes, including the Maurer's cleft trans-membrane protein PfSBP1 and the human protein LANCL1 [Blisnick *et al*. 2000; Blisnick *et al*. 2005]. Interestingly, the assembly of the PfSBP1-LANCL1 complex seems to correlate with post-translational modifications of PfSBP1. While three forms of PfSBP1 with slightly different electrophoretic migrations are detected in infected erythrocyte total extracts, two (PfSBP1-H and M) are detected in Maurer's clefts and only PfSBP1-H efficiently binds to LANCL1 [Blisnick *et al*. 2005]. In this paper, we show that the amino-terminal domains of PfSBP1-H and M are differentially phosphorylated and we characterise a parasite PP1 phosphatase modulating this phosphorylation status in the Maurer's clefts at late intraerythrocytic steps. This study investigates the relevance of this parasite PP1 phosphatase for the release of merozoites.

Results

Post-translational modifications of PfSBP1

Using specific antibodies raised against its amino- or carboxy-terminal domain, three forms of PfSBP1 with slightly different apparent molecular masses (named PfSBP1-H, PfSBP1-M and PfSBP1-L) are detected in total extracts of late trophozoites and early schizonts (Fig.1A lane 3) [Blisnick *et al*. 2005]. This observation suggests that PfSBP1 undergoes post-translational modifications that are likely related to its transport to Maurer's clefts, since only PfSBP1-H and PfSBP1-M are recovered from infected erythrocyte ghosts (Fig.1A lane 1) [Blisnick *et al*. 2000; Blisnick *et al*. 2005]. We tested whether the post-translationally modified forms of PfSBP1 are phosphorylated. Phosphoproteins specifically bind to gallium and are eluted using an excess of sodium phosphate. When total parasite extracts were applied to a gallium column, the two slowly migrating forms PfSBP1-H and –M were specifically retained and eluted (Fig.1A lane 4). Consistently, PfSBP1-H and –M were also recovered as phosphoproteins from ghost extracts of *P. falciparum*-infected erythrocytes (Fig.1A lane 2). The phosphorylation of PfSBP1 was confirmed by its [^{32}P] sodium phosphate metabolical labelling followed by immunoprecipitation using PfSBP1 specific antibodies. As shown in Fig.1B, a radiolabelled band is specifically detected in total (lanes 2 and 3) and ghost (lanes 5 and 6) extracts from late trophozoites and schizonts.

The analysis of the PfSBP1 amino acid sequence using NetPhos 2.0 (www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/) [Blom *et al*. 1999] led to the prediction of 15 phosphorylation sites at 9 serine, 4 threonine and 2 tyrosine residues. Among these putative phosphorylation sites, 14 are located within the amino-terminal domain of PfSBP1, previously localised to the lumen of Maurer's clefts [Blisnick *et al*. 2000]. Ten of these sites are within two trypsin-generated peptides, respectively Leu_{32} - Lys_{126} (8520.3 Da) and Asp_{127} -

Arg_{162} (3857.7 Da) (Fig.2A). In order to identify such phosphorylated peptides, PfSBP1 was purified from a ghost extract using Rotofor iso-electrofocalisation followed by SDS-PAGE. The 50 kDa band corresponding to PfSBP1 was excised from the gel and further submitted to trypsin digestion as described (Experimental procedures). Phosphorylation of the resulting peptides was analysed by Western blot, using a mix of phospho-aminoacid-specific antibodies (Fig.2B). A phosphorylated 8.5 kDa peptide was repeatedly detected, concordant with the predicted phosphorylation of the Leu_{32} - Lys_{126} peptide in Maurer's clefts' PfSBP1. The relative amounts of the various PfSBP1 forms were determined at different stages of the parasite intra-erythrocytic development (Fig.3). An apparent decrease in PfSBP1-H is observed in late schizonts harvested when merozoites are differentiated as compared to late trophozoites and early schizonts, both in total extracts and phosphoprotein samples (Fig.3).

Interaction of PfSBP1 with a PP1 type serine/threonine phosphatase

The presence of two phosphorylated forms of PfSBP1 in erythrocyte ghost preparations and the modulation of PfSBP1 phosphorylation during the parasite intra-erythrocytic development suggest that phosphorylation and de-phosphorylation events modulate its biological activity. When the PfSBP1 amino acid sequence was analysed using the Protein Phosphatase 1 (PP1) signature web site (http://pp1signature.pasteur.fr), the Asp_{13} - Thr_{122} amino-terminal sequence of PfSBP1, significantly aligned with 14 proteins known to interact with the serine/threonine phosphatase PP1. Type 1 serine/threonine phosphatase is an ubiquitous enzyme in eukaryotic cells, interacting with proteins that exhibit PP1 docking motifs (M1 = [RK]-x(0,1)-V-x-F and M2 = F-x-x-[RK]-x-[RK]) [Cohen 2002]. Noteworthy, a M1 type PP1 docking motif (Arg_{197}-Val_{198}-Gln_{199}-Phe_{200}) is present in the PfSBP1 sequence (Fig.2A). Taken together, these observations suggest that PfSBP1 interacts with a PP1-type phosphatase.

Such an interaction was further investigated using a monoclonal antibody (mAb) raised against the highly conserved amino-terminal domain of the human PP1α, and showing broad

species specificity (see Experimental procedures). This mAb specificity was first validated by Western blot (Fig. 4). It detected a protein of the expected molecular mass (37 kDa) in total extracts from uninfected (Fig.4A lane 1) and infected (Fig.4A lane 2) erythrocytes.

PfSBP1 interacts with a parasite serine/threonine phosphatase PP1 located in Maurer's clefts

The subcellular location of the erythrocyte PP1 phosphatase was first investigated by Western blotting: the protein is detected in ghost preparations from both uninfected (Fig.4 lane 3) and infected (Fig.4 lane 4) erythrocytes. Our results thus establish the presence of the erythrocyte PP1 phosphatase in an uninfected ghost extract. Immunofluorescence assays performed with ghost preparations from uninfected erythrocytes using the PP1α phosphatase specific mAb, confirmed the association of the erythrocyte PP1 phosphatase with the plasma membrane of uninfected erythrocytes (Fig.5c). Differently, an additional labelling similar to that of PfSBP1 is obtained for *P. falciparum*-infected red blood cells (Fig.5a) and *P. falciparum*-infected ghosts (Fig.5b). This result suggests the association of a PP1 phosphatase with Maurer's clefts.

Proteinase K digestion experiments were performed in order to confirm the location of the PP1 phosphatase in uninfected and infected red blood cells respectively. As presented in Fig.6, the erythrocyte enzyme is fully accessible to proteinase K digestion in a ghost preparation (Fig.6A lane 3) from uninfected erythrocytes. This demonstrates that the erythrocyte PP1 phosphatase is a cytosolic enzyme peripheral of the red cell plasma membrane. Differently, a 37 kDa PP1 type phosphatase is protected from proteinase K digestion in infected red cell ghost preparations in the absence of detergent (Fig.6B lane 3). When Triton X100 is added (Fig.6B lane 4), this enzyme is degraded illustrating its sensitivity to proteolysis and its localisation within closed vesicles recovered with the ghost fraction of infected erythrocytes. Noteworthy, Maurer's clefts are the unique closed membrane structures

yet identified in such ghost preparations. Based on the specificity of the antibodies, our results strongly suggest that the 37 kDa protein protected from proteinase K digestion and located in Maurer's clefts is a PP1 phosphatase of parasite origin.

Consistently, a metabolically labelled 37 kDa protein (arrowed) was immunoprecipitated by the PP1α specific monoclonal antibody from an extract of infected red cell ghosts (Fig.7A lane 2), confirming the presence of the previously identified 37 kDa *P. falciparum* PP1 phosphatase [Kumar *et al.* 2002] in this sub-cellular fraction. Thus, the parasite PP1 phosphatase located in the lumen of Maurer's clefts has access to the amino-terminal domain of PfSBP1 including the PP1 docking motif. Several metabolically labelled proteins are detected in the immunoprecipitate using the PP1α specific monoclonal antibody, suggesting interactions between the PP1 phosphatase(s) and parasite proteins resulting in their co-immunoprecipitation. Interestingly, as presented Fig.7B, PfSBP1 was detected in the immunoprecipitate obtained from a ghost extract using the PP1-specific mAb (Fig.7B lane 2). As a negative control, an immunoprecipitation was performed using a GST specific serum (Fig.7B lane 1).

Inhibition of PP1 type phosphatase results in PfSBP1 hyperphosphorylation and blocks merozoite release

To further characterise the biological relevance of the Maurer's clefts' PP1 type phosphatase we have investigated the effects of calyculin A, an inhibitor of PP1 phosphatases, on the parasite intra-erythrocytic development. Plasmagel-enriched mature schizonts (8 to 16 nuclei) were treated for 1 hour in culture conditions with 1μM calyculin A. Protein extracts were prepared, the phosphoproteins recovered following gallium affinity chromatography as described (Experimental Procedures) and analysed by polyacrylamide gel electrophoresis. The global pattern of phosphorylated proteins was not altered in response to the inhibitory

treatment (data not shown). However, Western blot analysis using a PfSBP1 specific serum shows a reproducible and significant decrease of PfSBP1-L and increase of PfSBP1-H following calyculin A treatment (Fig.8 lane 3 *versus* lane 1). Consistently, phosphoprotein purification reveals an increase of the two phosphorylated forms of PfSBP1, PfSBP1-H and M (Fig.8 lane 4 *versus* lane 2) in response to PP1 phosphatase inhibition.

The maturation of *P. falciparum* schizonts to invasive merozoites was evaluated by the re-invasion rates (Fig.9A) and percentage of residual schizonts (Fig.9B) 18 hours after a one hour treatment with calyculin A of mature schizonts (≥ 8 nuclei). A dose-dependent decrease of re-invasion and an accumulation of residual segmenters were observed. The fact that only segmenters were detected indicates that schizonts matured normally. Immature schizonts were only detected when calyculin A was used at a 1μM concentration. The IC50 of calyculin A for re-invasion is about 30 nM.

Discussion

We have previously shown that the Maurer's clefts trans-membrane protein PfSBP1 interacts with the host cell protein LANCL1 *via* its carboxy-terminal domain, an interaction depending on post-translational modifications of PfSBP1 [Blisnick *et al*. 2000; Blisnick *et al*. 2005]. Here we further investigate the nature of these post-translational modifications. The metabolic labelling of *P. falciparum*-infected erythrocytes using [^{32}P] sodium phosphate reveals that PfSBP1 is phosphorylated; more precisely, the affinity for gallium of two forms of PfSBP1, PfSBP1-H and –M, and their accumulation following treatment with a phosphatase inhibitor establish that only these forms of PfSBP1 are phosphorylated. Importantly, these two forms are the ones recovered from Maurer's clefts, indicating that the phosphorylation of PfSBP1 correlates with its translocation beyond the confines of the parasite.

Phosphorylation sites of PfSBP1 are essentially predicted in the amino-terminal domain of the protein, located in the lumen of Maurer's clefts. The detection of a 8500 Da trypsin degradation product of PfSBP1 by phospho-amino acid specific antibodies, as well as the detection of two forms of the amino-terminal domain of PfSBP1 following proteinase K digestion [Vincensini *et al*. 2005] are consistent with this prediction. Noteworthy, various parasite kinases are possibly located in the clefts [Kappes *et al*. 1999] and may take on PfSBP1 phosphorylation. It has been recently shown that the parasite glycogen synthase kinase 3 (PfGSK3) is located in Maurer's clefts and that PfSBP1 might be a substrate of this enzyme, based on a predicted targeting motif in the amino-terminal domain of PfSBP1 [Droucheau *et al*. 2004]. This site is located upstream from a predicted PP1 docking motif, in the 3857.7 Da tryptic peptide of PfSBP1. Due to the electrophoretic conditions that we have used and its low molecular mass, this peptide could not have been detected as phosphorylated.

In addition to the presence of a PP1 phosphatase docking motif in the amino-terminal domain of PfSBP1, the PfSBP1 protein sequence aligns with 14 proteins known to interact with PP1

serine/threonine phosphatases. These enzymes are highly conserved and known to play essential regulatory functions in various cellular pathways [Bollen and Stalmans 1992; Barton *et al.* 1994]. Recent studies identified a *P. falciparum* gene, encoding a protein designated as PfPP1, which is highly similar (> 80%) to PP1 phosphatases from various organisms and complements a PP1 mutant of *Saccharomyces cerevisiae* [Kumar *et al.* 2002; Bhattacharyya *et al.* 2003]. The *P. falciparum* PP1 phosphatase (PfPP1) amino-terminal region is highly similar to that of human PP1 phoshatase [Kumar *et al.* 2002]. Thus, we used a monoclonal antibody raised against the Glu_5 - Pro_{226} region of human PP1α, to assess whether PfSBP1 interacts with a PP1 type phosphatase and the relevance of this interaction for the parasite intra-erythrocytic cycle.

Two PP1 phosphatases may interact with PfSBP1, the erythrocyte enzyme and PfPP1. We have determined the location of these enzymes in uninfected and infected erythrocytes. Western blot analyses and immunofluorescence studies revealed the presence of the erythrocyte PP1 phosphatase in the uninfected erythrocyte ghost fraction. In addition, a parasite protein with the expected molecular mass of PfPP1 (37 kDa) is immunoprecipitated from metabolically labelled infected erythrocyte ghost extracts, using a PP1 specific monoclonal antibody. To determine the respective localisation of the erythrocyte and parasite phosphatases, proteinase K degradation assays were performed. While the erythrocyte PP1 was efficiently degraded by proteinase K in uninfected red cell ghosts, the PfPP1 from infected erythrocyte ghosts was not proteolysed in the absence of detergent. Thus, the parasite PfPP1 phosphatase is likely located in the lumen of the Maurer's clefts, a hypothesis consistent with our immunofluorescence studies. Interestingly, PfPP1 is the first enzyme located into Maurer’s clefts proposed to be essential for the intra-erythrocytic parasite development, based on RNA interference data [Kumar *et al.* 2002]. Because the PP1 docking motif and the phosphorylation sites of PfSBP1 are located in its amino-terminal domain, in

the lumen of Maurer's clefts, the phosphorylation status of PfSBP1 is likely modulated by this parasite PfPP1 phosphatase.

Previous studies established that uninfected erythrocytes possess mainly a PP2A type phosphatase activity [Yokoyama *et al.* 1998]. In *P. falciparum* infected erythrocytes, this PP2A activity is not increased, while a predominant PP1 activity is detected and efficiently inhibited by calyculin A [Yokoyama *et al.* 1998]. Thus, in *P. falciparum* infected erythrocytes, the main target of calyculin A, an inhibitor of PP1 and PP2A phosphatases, is likely the parasite PfPP1 phosphatase. Among the two differentially phosphorylated forms of PfSBP1, PfSBP1-H is specifically accumulated in response to a treatment with calyculin A. This result establishes that PfSBP1-H is a substrate for the parasite PP1 phosphatase in the lumen of Maurer's clefts. Interestingly, PfSBP1-H is the form of PfSBP1 that has the highest affinity for the erythrocyte protein LANCL1 [Blisnick *et al.* 2005]. Thus, PfPP1 may modulate this interaction which could contribute to the altered mechanical properties of the red cell membrane preventing its premature rupture during parasite development [Blisnick *et al.* 2005]. Indeed reversible phosphorylation of erythrocyte skeletal and membrane proteins has been shown to regulate the red cell shape and deformability [Fairbanks *et al.* 1978; Cohen and Foley 1986]. We have tested whether the release of merozoites is affected by the inhibition of the PfPP1 phosphatase.

Because the PP1-specific mammalian inhibitors I-1 and I-2 do not enter into infected erythrocytes, we have used calyculin A. Because the PfPP1 phosphatase is expressed in trophozoites and likely implicated in various pathways of the parasite development, we have restricted our study to mature schizonts (8 to 16 nuclei). When *P. falciparum* mature schizonts were incubated for one hour in the presence of calyculin A, their maturation to segmenters was essentially not affected: residual immature schizonts were only detected with a frequency $\leq 10\%$ at a 1μM calyculin A concentration. However, re-invasion was strongly affected with

an IC50 of about 30 nM, consistent with previous studies [Yokoyama *et al*. 1998]. Taken together, our results show that the release of merozoites depends on a PP1 phosphatase.

Interestingly, the treatment of maturing schizonts with PP1 inhibitors does not induce major changes of the parasite and red cell phosphoproteomes. Indeed, we only detected the hyper-phosphorylation of PfSBP1. Although we cannot exclude that the hyperphosphorylation of minor erythrocyte or parasite proteins remained undetected in these experiments, this result is consistent with previous studies reporting the hyperphosphorylation of a unique 50 kDa protein in *P. falciparum*-infected erythrocytes in response to the calyculin A treatment of mature schizonts [Bhattacharyya *et al*. 2003]. Thus the effect of calyculin A on merozoite release might be a consequence of the PfSBP1 hyperphosphorylation, as a result of the inhibition of PfPP1 in Maurer's clefts.

Interestingly, this process may be conserved among *Plasmodium* species. Noteworthy, PfSBP1 specific antibodies react with a 45 kDa polypeptide from the rodent parasites *P. chabaudi* and *P. berghei,* located in Maurer's clefts like structures [Blisnick *et al*. 2000]. In addition, a 43 kDa protein (M 43) has been detected in ghost preparations from *P. berghei* infected erythrocytes, the phosphorylation of which correlates with the osmotic fragility and filterability of the parasitized cells [Yuthavong and Limpaiboon 1987]. Indeed, the enhanced phosphorylation of this 43 kDa protein was associated with greater red cell membrane stability and was proposed to counterbalance host membrane changes during the parasite development that could result in a premature release of merozoites. A decrease of M 43 phosphorylation was observed in schizonts as compared to trophozoites. Based on its kinetics of expression, molecular mass, phosphorylation and subcellular localisation, this 43 kDa protein is likely to be the *P. berghei* analogue of PfSBP1.

Our results strongly support the hypothesis that the release of merozoites depends on the activity of the parasite PP1 type phosphatase in the lumen of Maurer's clefts that modulates the phosphorylation level of PfSBP1. The identification of phosphatase and kinase activities within Maurer's clefts indicates that signal transduction pathways across the Maurer's clefts membrane may regulate the biological role of this novel secretory compartment. However, the parasite PP1 phosphatase is expressed throughout the erythrocytic cycle of the parasite and calyculin A also inhibits trophozoite development efficiently; moreover, RNA interference data has underlined the essential role of the parasite phosphatase 1 activity for the growth of *P. falciparum*. Consequently, the biological role of the PfPP1 phosphatase is not likely restricted to the release of merozoites. Indeed, PP1 phosphatases play essential roles in eukaryotic cells by regulating an enormous variety of cellular functions [Cohen 2002]. Further characterisation of the location of PfPP1 in different blood stages and of molecular processes depending on this enzyme should clarify its roles for the parasite development.

Experimental Procedures

Parasite culture and metabolic labelling. *P. falciparum* 3D7 was grown *in vitro* under standard culture conditions [Braun Breton *et al.* 1986]. The parasite knobby phenotype was maintained by Plasmagel floatation [Pasvol *et al.* 1978]. For metabolic labelling experiments, early trophozoites were incubated for 18 hours at 37°C in standard culture medium supplemented with 250 μCi ml^{-1} [^{35}S]-(methionine + cysteine) (TranS^{35}-label, ICN) or [^{32}P] sodium phosphate (ICN). Subsequent analyses were performed on mature trophozoites and schizonts collected by Plasmagel floatation. Synchronisation of the parasite intra-erythrocytic development was obtained following successive rounds of treatment using 0.3 M alanine, 10mM HEPES pH 7.5 as described [Braun Breton *et al.* 1986].

Preparation of ghosts from uninfected and infected erythrocytes. Uninfected and infected erythrocytes were washed extensively in RPMI 1640 medium and lysed in hypotonic buffer as described [Blisnick *et al.* 2000]. The lysates were then separated by centrifugation into a cytosolic fraction and a pellet containing ghosts and free parasites. The ghosts were recovered from the pellet by differential centrifugation and extensive washing with the hypotonic buffer and stored as a pellet at -20°C or further handled for indirect immunofluorescence assays. Extraction of ghost proteins was performed in 1% Triton X100, 1 M NDSB201, 10 mM Tris pH 7.5 supplemented with 10 μg ml^{-1} leupeptin and pepstatin as described [Blisnick *et al.* 1998].

Proteinase K digestion of ghost preparations. Freshly prepared ghosts from uninfected and P. falciparum infected erythrocytes were submitted to proteinase K digestion as described [Blisnick et al. 1998]. The resulting samples were analysed by Western blotting using a PP1α specific monoclonal antibody (BD Biosciences; P35220).

Purification and trypsin digestion of PfSBP1 from P. falciparum *infected erythrocyte ghosts*. One ml of pelleted ghosts was incubated in one volume of 1% Triton X100, 1% SB3-14, 2 M

NDSB201, 10 mM Tris-HCl pH 7.5 for 30 min at room temperature. The detergent soluble proteins were recovered as the supernate of a 30 min centrifugation at 12 000 g, 4°C, and separated for 4 hrs at 4°C, 11 W, in a 2% Pharmalytes, 1% Triton X100, 1 M NDSB201 pre-formed pH 3 to 10 gradient, using a Rotofor Cell (Bio-Rad) as described [Blisnick *et al.* 1998]. Twenty 2 ml fractions were recovered and further analysed for pH and by polyacrylamide gel electrophoresis under denaturing conditions (SDS-PAGE). The pH 4.3 Rotofor fraction was concentrated in a Biotrap cell (Schleicher & Schuell) and electrophoresed. The Coomassie stained (Biosafe Bio-Rad) PfSBP1 band (approximately 0.1 μg) was cut from the gel and incubated over-night at 30°C in 100μl 50mM Tris-HCl pH 8.6, 1 μg ml^{-1} pig trypsin (SIGMA). The resulting peptides were extracted by 3 successive incubations of the gel slice in 100μl 60% acetonitrile, for 15 min at room temperature. Acetonitrile was evaporated in a Speed-vacuum apparatus and the resulting 100 μl peptide preparation further analysed by SDS-PAGE and Western blotting.

Purification of phosphorylated proteins. The phosphorylated proteins were separated from both cellular and ghost extracts, using a PhosphoProtein Purification Kit (QIAGEN) according to the manufacturer's indications, with the appropriate modifications for efficient extraction of PfSBP1. Briefly, mature trophozoites and schizonts were recovered by Plasmagel floatation, packed and lysed in one volume of bi-distilled water. The proteins were extracted by incubating one volume of lysate with ten volumes of QIAGEN Lysis Buffer for 30 min at 4°C. The lysate was centrifuged at 10000 g and 4°C for 30 min and the supernatant harvested and diluted to a 0.1 mg ml^{-1} protein concentration. 2.5 mg of total protein were applied to a PhosphoProtein Purification Column and the phosphoproteins recovered in PBS as instructed by the manufacturer. When needed, the phosphoprotein fractions were ten fold concentrated using Nanosep ultrafiltration columns as instructed (QIAGEN).

Protein immunodetection. Immunoprecipitation assays of 1% Triton X100, 1 M NDSB201 protein extracts were performed as described [Blisnick *et al*. 2000] and the samples analysed by SDS-PAGE. The gels were processed for fluorography [Bonner and Laskey 1974] and exposed to Kodak Biomax MS films. Immunoblotting assays were performed as described [Blisnick *et al*. 2000]. The PfSBP1- specific sera raised against the carboxy-terminal domain (B28) or the amino-terminal domain (BR5) of the protein expressed as GST fusion proteins, have been previously validated and were used at a 1/200 dilution for both immunoprecipitation and immunoblot assays [Blisnick *et al*. 2000]. Phosphoserine, phosphothreonine and phosphotyrosine- specific monoclonal antibodies from ascitic fluids (SIGMA) were pooled and used at a 1/1000 dilution. Human phosphatase PP1α specific monoclonal antibody is from BD Biosciences and was used at a 1/1000 dilution for immunoblots and 1/100 dilution for immunoprecipitations and indirect immunofluorescence assays.

Indirect immunofluorescence assays were performed on 3.7% formaldehyde-fixed and 0.5% Triton X100 permeabilised erythrocytes or resealed ghosts using poly-lysine coated slides [Read *et al*. 1993]. The ghosts were prepared as described [Blisnick *et al*. 2000], resuspended in RPMI 1640 and incubated 15 min at 37°C before use.

Acknowledgements

We thank A. Garcia for the generous gift of the antibodies to human PP1α. We are grateful to H. Vial for his support, to JC Barale, A. Garcia and C. Doerig for helpful discussions and to K. Wengelnik for critical reading of the manuscript. L.Vincensini was supported by grants from the Ministère Français de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie and from the Fonds Inkermann de la Fondation de France. Gamou Fall was supported by a grant from the Ministère de l'Éducation Nationale du Sénégal. This work was supported by the Pasteur Institute, the Centre National de la Recherche Scientifique, the BioMalPar network of excellence of the European Comunity and the "Programme de Recherche Fondamentale en Microbiologie et Maladies Infectieuses et Parasitaires" from the Ministère Français de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie.

References

Adisa, A., Albano, F.R., Reeder, J., Foley, M. and Tilley, L. (2001). Evidence for a role for a *Plasmodium falciparum* homologue of Sec31p in the export of proteins to the surface of malaria parasite-infected erythrocytes. *J. Cell Sci.* **114**: 3377-3386.

Albano, F.R., Berman, A., La Greca, N., Hibbs, A.R., Wickham, M., Foley, M. and Tilley, L. (1999). A homologue of Sar1p localises to a novel trafficking pathway in malaria-infected erythrocytes. Eur. *J. Cell. Biol.* **78**: 453-462.

Barton, G.J., Cohen, P.T. and Barford, D. (1994). Conservation analysis and structure prediction of the protein serine/threonine phosphatases. Sequence similarity with diadenosine tetraphosphatase from *Escherichia coli* suggests homology to the protein phosphatases. *Eur. J. Biochem.* **220**: 225-237.

Beeson, J.G. and Brown, G.V. (2002). Pathogenesis of *Plasmodium falciparum* malaria: the roles of parasite adhesion and antigenic variation. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**: 258-271.

Bhattacharyya, M.K., Hong, Z., Kongkasuriyachai, D. and Kumar, N. (2003). *Plasmodium falciparum* protein phosphatase type 1 functionally complements a glc7 mutant in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Parasitol.* **32**: 739-747.

Blisnick, T., Morales-Betoulle, M.E., Vuillard, L., Rabilloud, T. and Braun-Breton, C. (1998). Non-detergent sulphobetaines enhance the recovery of membrane and/or cytoskeleton-associated proteins and active proteases from erythrocytes infected by *Plasmodium falciparum*. *Eur.J.Biochem.* **252**: 537-541.

Blisnick, T., Morales Betoulle, M.E., Barale, J.C., Fujioka, H., Uzureau, P., Berry, L., Desroses, S., Mattei, D. and Braun Breton. C. (2000). PfSBP1, a Maurer's cleft *Plasmodium falciparum* protein, is associated with the erythrocyte skeleton. *Mol. Biochem. Parasitol.* **111**: 107-121.

Blisnick, T., Vincensini, L., Barale, J.C., Namane, A. and Braun Breton C. (2005). LANCL1, an erythrocyte protein recruited to the Maurer's clefts during *Plasmodium falciparum* development. *Mol. Biochem. Parasitol.* **141**: 39-47.

Blom, N., Gammeltoft, S. and Brunak, S. (1999). Sequence- and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J. Mol. Biol.* **294**: 1351-1362.

Bollen, M. and Stalmans, W. (1992). The structure, role, and regulation of type 1 protein phosphatases. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* **27**: 227-281.

Bonner, W.M. and Laskey, R.A. (1974). A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur. J. Biochem.* **46**: 83-88.

Braun-Breton, C., Jendoubi, M., Brunet, E., Perrin, L., Scaife, J. and Pereira da Silva, L.H. (1986). *In vivo* time course of synthesis and processing of major schizont membrane polypeptides in *Plasmodium falciparum. Mol. Biochem. Parasitol.* **20**: 33-43.

Cohen, C.M. and Foley, S.F. (1986). Organization of the spectrin-actin-band 4.1 ternary complex and its regulation by band 4.1 phosphorylation. I: Membrane skeleton and cytoskeletal-membrane associations. Bennett V., Cohen C.M., Lux S.E. and Palek J. (eds). Alan R. Liss, New York, pp 211-222.

Cohen, P.T.W. (2002). Protein phosphatase 1 targeted in many directions. *J. Cell. Sci.* **115**: 241-256.

Droucheau, E., Primot, A., Thomas V., Mattei, D. Knockaert, M., Richardson, C., Sallicandro, P., Alano, P., Jafarshad, A., Baratte, B., Kunick, C., Parzy, D., Pearl, L., Doerig, C. and Meijer, L. (2004). *Plasmodium falciparum* glycogen synthase kinase-3: molecular model, expression, intracellular localisation and selective inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta* **1697**: 181-196.

Fairbanks, G., Avruch, J., Dino, J.E. and Patel, O.P. (1978). Phosphorylation and dephosphorylation of spectrin. *J. Supramol. Struct.* **9**: 97-112.

Flick, K. and Chen, Q. (2004). *var* genes, PfEMP1 and the human host. *Mol Biochem Parasitol.* **134**: 3-9.

Haldar, K., Mohandas, N., Samuel, B.U., Harrison, T., Hiller, N.L., Akompong, T. and Cheresh, P. (2002). Protein and lipid trafficking induced in erythrocytes infected by malaria parasites. *Cell. Microbiol.* **4**: 383-395.

Hayashi, M., Taniguchi, S., Ishizuka, Y., Kim, H.S., Wataya, Y., Yamamoto, A. and Moriyama, Y. (2001). A homologue of *N*-ethylmaleimide-sensitive factor in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* is exported and localized in vesicular structures in the cytoplasm of infected erythrocytes in the brefeldin A-sensitive pathway. *J. Biol. Chem.* **276**: 15249-15255.

Heddini, A., Pettersson, F., Kai, O., Shafi, J., Obiero, J., Chen, Q., Barragan, A., Wahlgren, M. and Marsh K. (2001). Fresh isolates from children with severe *Plasmodium falciparum* malaria bind to multiple receptors. *Infec. Immun.* **69**: 5849-5856.

Hinterberg, K., Scherf, A., Gysin, J., Toyoshima, T., Aikawa, M., Mazie, J.C., Pereira da Silva, L.H. and Mattei, D. (1994). *Plasmodium falciparum*: the Pf332 antigen is secreted from the parasite by a brefeldin A-dependent pathway and is translocated to the erythrocyte membrane *via* the Maurer's clefts. *Exp. Parasitol.* **79**: 279-291.

Kappes, B., Doerig, C.D. and Graser, R. (1999). An overview of *Plasmodium* protein kinases. *Parasitol. Today* **15**: 449-454.

Kaviratne, M., Khan, S.M., Jarra, W. and Preiser, P.R. (2002). Small variant STEVOR antigen is uniquely located within Maurer's clefts in *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *Eukaryotic Cells* **1**: 926-935.

Kriek, N., Tilley, L., Horrocks, P., Pinches, R., Elford, B.C., Ferguson, D.J., Lingelbach, K. and Newbold, C.I. (2003). Characterization of the pathway for transport of the cytoadherence-mediating protein, PfEMP1, to the host cell surface in malaria parasite-infected erythrocytes. *Mol. Microbiol.* **50**: 1215-1227.

Kumar, R., Adams, B., Oldenburg, A., Musiyenko, A. and Barik, S. (2002). Characterisation and expression of a PP1 serine/threonine protein phosphatase (PfPP1) from the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*: demonstration of its essential role using RNA interference. *Malaria J.* **1**: 5.

Martinez, L., Clavjo, C.A. and Winograd, E. (1998). Identification of peripheral membrane proteins associated with the tubovesicular network of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **91**: 273-280.

Pasvol, G., Wilson, R.J.M., Smalley, M.J. and Brown, J. (1978). Separation of viable schizont-infected red blood cells of *Plasmodium falciparum* from human blood. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **72**: 87-88.

Read, M., Sherwin, T., Holloway, S.P., Gull, K. and Hyde, J.E. (1993). Microtubular organization visualized by immunofluorescence microscopy during erythrocytic schizogony in *Plasmodium falciparum* and investigation of post-translational modifications of parasite tubulin. *Parasitology* **106**: 223-232.

Vincensini, L., Richert, S., Blisnick, T., Van Doresselear A., Leize-Wagner E., Rabilloud, T. and Braun Breton C. (2005) *Mol. Cell. Proteomics* **4.4**: 582-593.

Wickert, H., Wissing, F., Andrews, K.T., Stich, A., Krohne, G. and Lanzer, M. (2003). A putative Sec23 homologue of *Plasmodium falciparum* is located in Maurer's clefts. *Mol. Biochem. Parasitol.* **129**: 209-213.

Wickham, M.E., Rug, M., Ralph, S.A., Klonis, N., McFadden, G.I., Tilley, L. and Cowman, A.F. (2001). Trafficking and assembly of the cytoadherence complex in *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes. *EMBO J.* **20**: 5636-5649.

Wilkins, M.R., Gasteiger, E., Bairoch, A., Sanchez, J.-C., Williams, K.L., Appel, R.D. and Hochstrasser, D.F. (1998). Protein Identification and Analysis Tools in the ExPASy Server. 2-D Proteome Analysis Protocols. (A.J. Link. Editor). Humana Press, New Jersey.

Wilkins, M.R., Lindskog, I., Gasteiger, E., Bairoch, A., Sanchez, J.-C., Hochstrasser, D.F., and Appel, R.D. (1997). Detailed peptide characterisation using PEPTIDEMASS - a World-Wide Web accessible tool. *Electrophoresis* **18**: 403-408.

Yokoyama, D., Saito-Ito, A., Asao, N., Tanabe, K., Yamamoto, M. and Matsumura T. (1998). Modulation of the growth of *Plasmodium falciparum in vitro* by protein serine/threonine phosphatase inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **247**: 18-23.

Yuthavong, Y. and Limpaiboon, T. (1987). The relationship of phosphorylation of membrane proteins with the osmotic fragility and filterability of *Plasmodium berghei*-infected mouse erythrocytes. Biochim. Biophys. Acta **929**: 278-287.

Figure Legends

Figure 1: PfSBP1 undergoes post-translational modifications. (A) Ghost and total extracts (lanes 1 and 3) from *P. falciparum*-infected red blood cells (IRBC) were applied to a gallium column and the specifically bound proteins eluted using phosphate buffered saline (lanes 2 and 4). The samples correspond respectively to 2 10^5 (IRBC) and 4 10^5 (ghost) infected red blood cells. PfSBP1 was detected by Western blot using specific antibodies raised against its amino-terminal domain (BR5) [Blisnick *et al*. 2000]. The three forms of PfSBP1 are indicated. (B) Immunoprecipitations of [^{32}P]-labelled parasite proteins from total (lanes 1 - 3) and ghost (lanes 4 - 6) extracts from *P. falciparum* infected erythrocytes, using sera raised against GST (lanes 1 and 4), GST-B28 (the carboxy-terminal domain of PfSBP1) (lanes 2 and 5) and GST-BR5 (lanes 3 and 6). The samples correspond respectively to 2 10^4 (IRBC) and 10^4 (ghost) infected red blood cells.

Figure 2: The amino-terminal domain of Maurer's clefts' PfSBP1 is phosphorylated. (A) Sequence of the PfSBP1 protein with the trans-membrane domain (in italics and underlined in gray), the putative phosphorylation sites (oversized), PP1 phosphatase M1 type docking site (bold, oversized and underlined) and trypsin-digestion peptides (framed; the predicted molecular masses are indicated). Phosphorylation sites were predicted using NetPhos 2.0 (www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/) and the M1 PP1 docking site using the PP1 signature web site (http://pp1signature.pasteur.fr). The molecular masses of the PfSBP1 peptides generated by trypsin digestion were calculated using Peptide Mass (http://www.expasy.org/tools/peptide-mass.html) [Wilkins *et al*. 1997; Wilkins *et al.* 1998].

(B) PfSBP1 was purified from a *P. falciparum*-infected erythrocyte ghost extract and trypsin-digested as described (Experimental procedures). Digestion products were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose and detected using a pool of phosphoserine,

phosphothreonine and phosphotyrosine-specific monoclonal antibodies. Molecular mass markers (kDa), PfSBP1 and its 8,5 kDa degradation product (arrowed) are indicated.

Figure 3: Post-translational modifications of PfSBP1 during the parasite intra-erythrocytic development. Western blot analysis of total extracts (total) and phosphoproteins (phospho) recovered by gallium affinity chromatography from late trophozoites and early schizonts (panel A) or late schizonts (panel B), using a pool of anti-PfSBP1 antibodies. The three forms of PfSBP1 are indicated.

Figure 4: Validation of the PP1 specific monoclonal antibody for uninfected and infected erythrocytes. Western blot analysis of total (lanes 1 and 2) and ghost (lanes 3 and 4) extracts from uninfected (RBC; lanes 1 and 3) and *P. falciparum*-infected (IRBC; lanes 2 and 4) erythrocytes, using a monoclonal antibody specific for human PP1α phosphatase with broad species specificity (Experimental procedures). The samples correspond respectively to 10^7 (total extracts) and 3. 10^6 (ghost extracts) red blood cells. The molecular mass markers are indicated (kDa).

Figure 5: Localisation of the PP1 phosphatases. Immunofluorescence assays were performed with intact *P. falciparum* trophozoites (a) and ghost preparations from *P. falciparum*-infected (b) and uninfected (c) red blood cells, using the PP1α specific mAb.

Figure 6: Topology of the erythrocyte and parasite PP1 phosphatases. Ghosts were prepared from uninfected (RBC) and *P. falciparum*-infected (IRBC) erythrocytes and incubated in hypotonic buffer (lanes 1) supplemented with 0.5% Triton X100 (TX100) (lanes 2), 5 mg ml^{-1} proteinase K (PK) (lanes 3) or 0.5% Triton X100 and 5 mg ml^{-1} proteinase K (lanes 4) as indicated. The digest products were analysed by Western blotting using the PP1α specific mAb. The 37 kDa PP1 polypeptides are arrowed.

Figure 7: Interaction between Maurer's clefts' PfSBP1 and the parasite serine/threonine phosphatase PP1. (A) Immunoprecipitation of [^{35}S] (methionine + cysteine) metabolically labelled parasite proteins using an unrelated serum reacting with the Pf72Hsp70 chaperone (lane 1) and PP1α specific monoclonal antibody (lane 2). The [^{14}C] labelled molecular mass markers (Amersham) are indicated (kDa). The 37 kDa PfPP1 polypeptide is arrowed. (B) Western blot analysis of *P. falciparum*-infected erythrocyte ghost protein immunoprecipitates using a monkey serum raised against the carboxy-terminal domain of PfSBP1 (GST-B28). Immunoprecipitations of ghost proteins were performed using an unrelated serum (raised against GST) (lane 1) or the PP1α specific monoclonal antibody (lane 2). The total ghost extract has been loaded lane 3. The samples loaded on the gel correspond respectively to 5 10^6 (total) and 1.5 10^7 (immunoprecipitates) infected erythrocytes. The molecular mass markers are indicated (kDa)

Figure 8: Hyperphosphorylation of PfSBP1 following calyculin A treatment of* P. falciparum*-infected erythrocytes. *P. falciparum* schizonts (≥ 8 nuclei) were incubated for one hour at 37°C in the presence (+) or absence (-) of 1μM calyculin A. Phosphoproteins were recovered by affinity chromatography (phosphoprotein purification kit QIAGEN). Western blot analysis was performed using PfSBP1 specific antibodies on total extracts (lanes 1 and 3) and phosphoprotein eluates (lanes 2 and 4). The three forms of PfSBP1 are indicated.

Figure 9: Schizont maturation and red cell invasion following calyculin A treatment of* P. falciparum *mature schizonts. *P. falciparum* schizonts (2% parasitemia; ≥ 8 nuclei) were cultured for 1hr in the presence of increasing concentrations of calyculin A. The cells were then washed and incubated for 18 hours at 37°C. Newly formed trophozoites (A) and residual schizonts (B) were counted on Giemsa stained smears of these cultures. The percentage of newly formed trophozoites, is calculated as the ratio of the parasitemia in the sample to that in the positive control (no calyculin A) determined after 18 hours of culture. The percentage of

residual schizonts, is calculated as the ratio of the parasitemia in the sample to that in the control before calyculin A addition. The results correspond to the average and extreme values obtained for 2 independent experiments performed in triplicate. *: detection of immature schizonts (less than 10% of total residual segmenters).

Figure 1

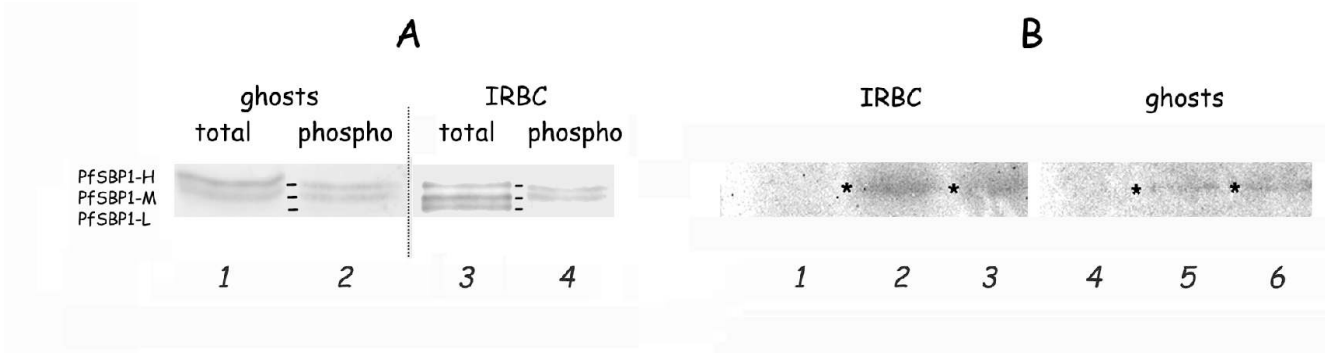


Figure 2

Figure 3

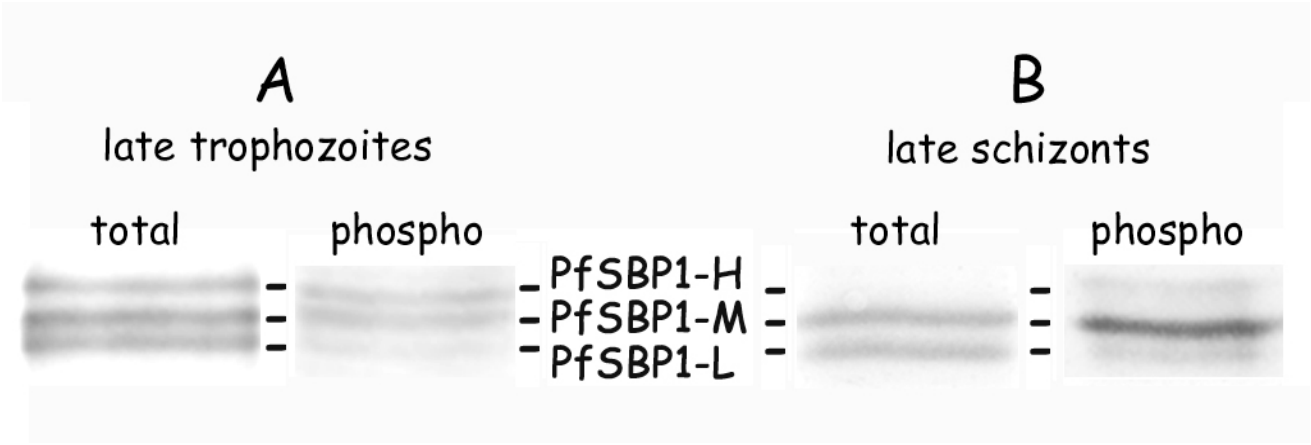


Figure 4

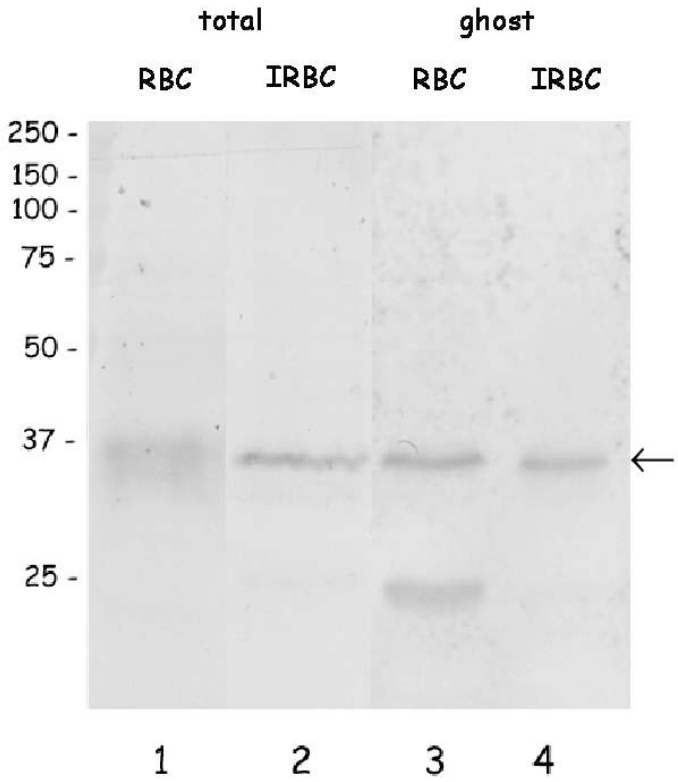


Figure 5

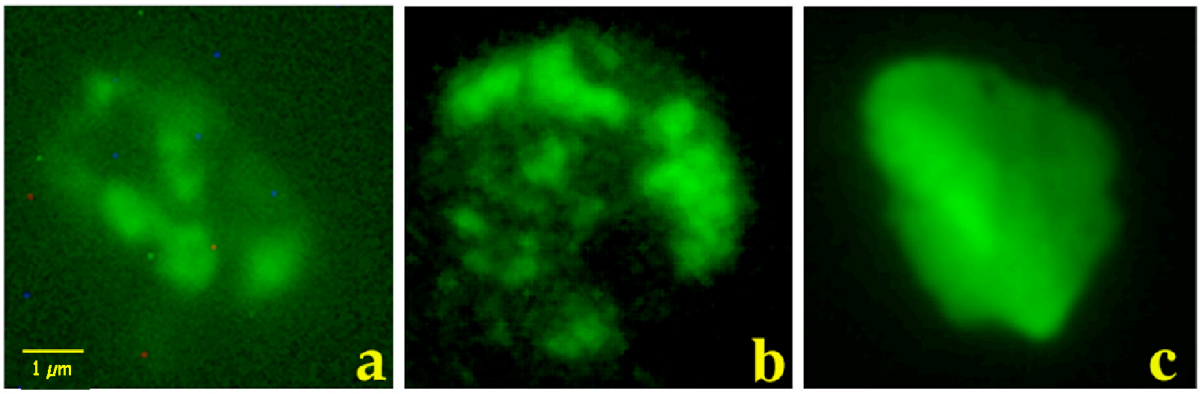


Figure 6

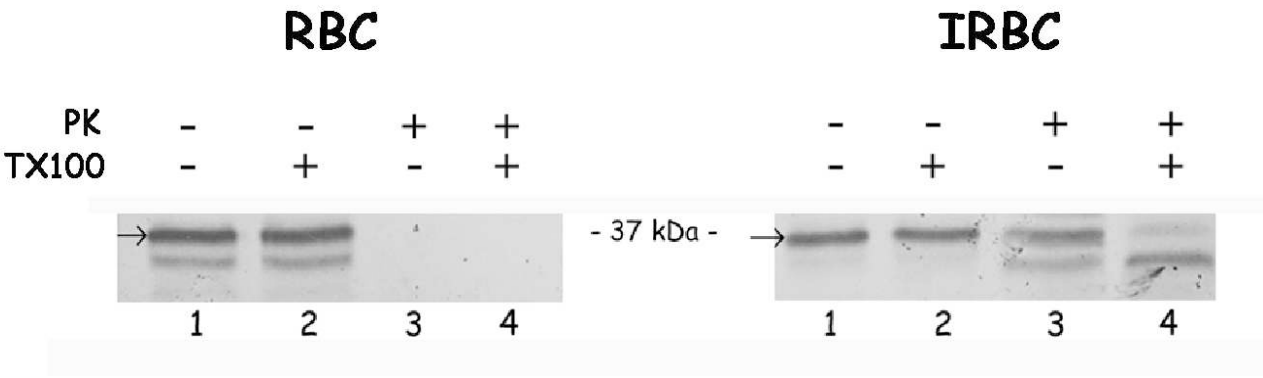


Figure 7

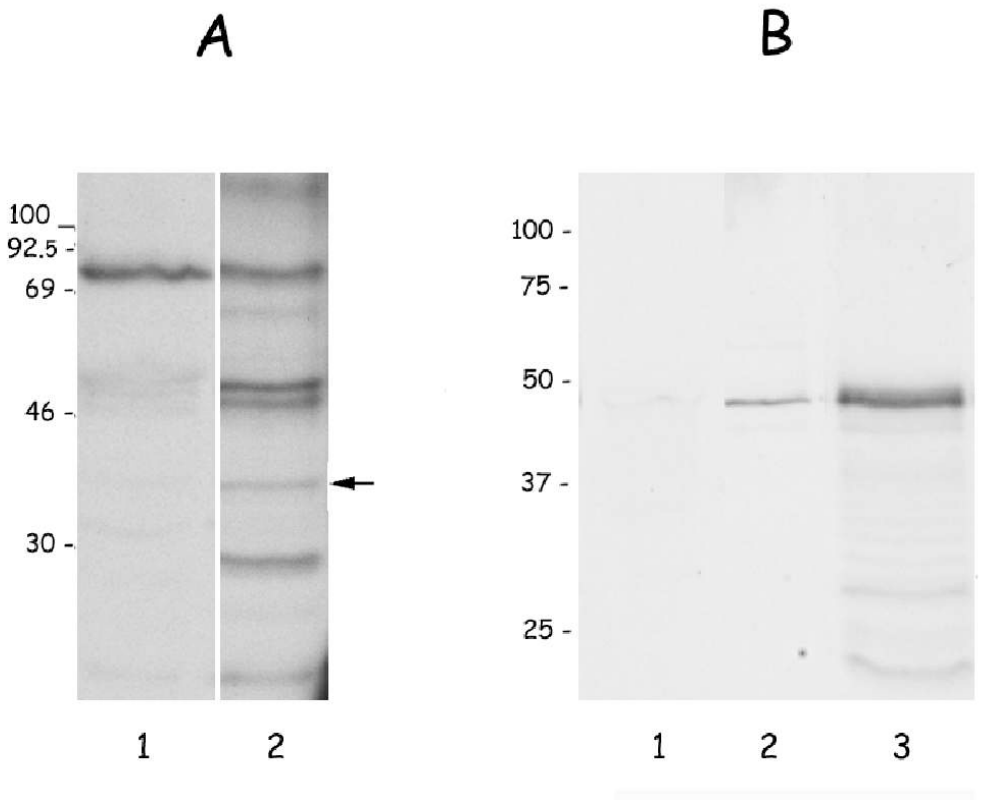


Figure 8

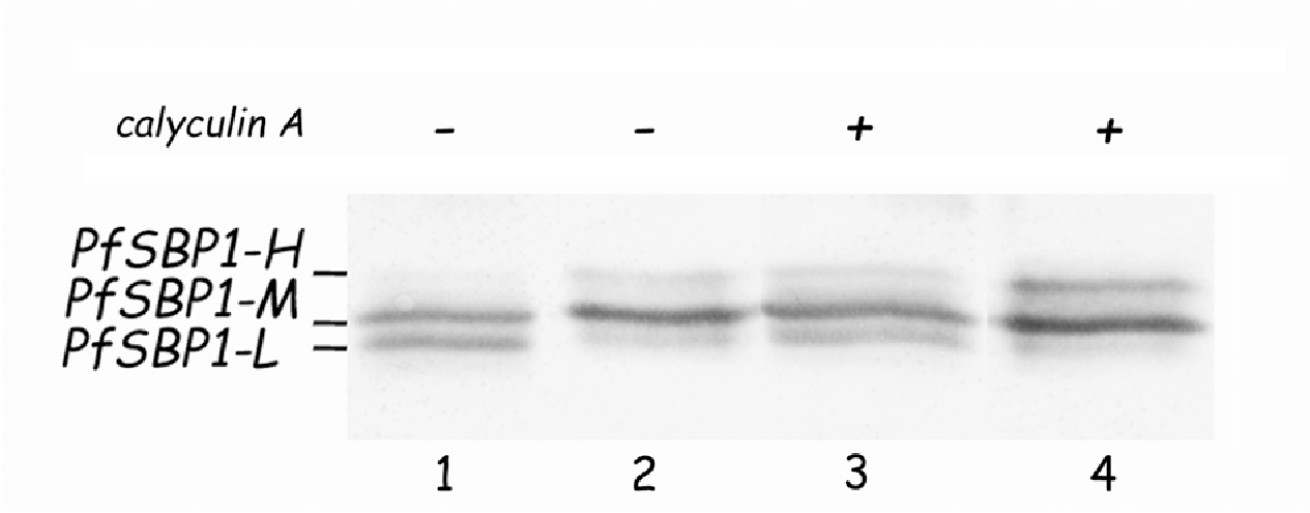
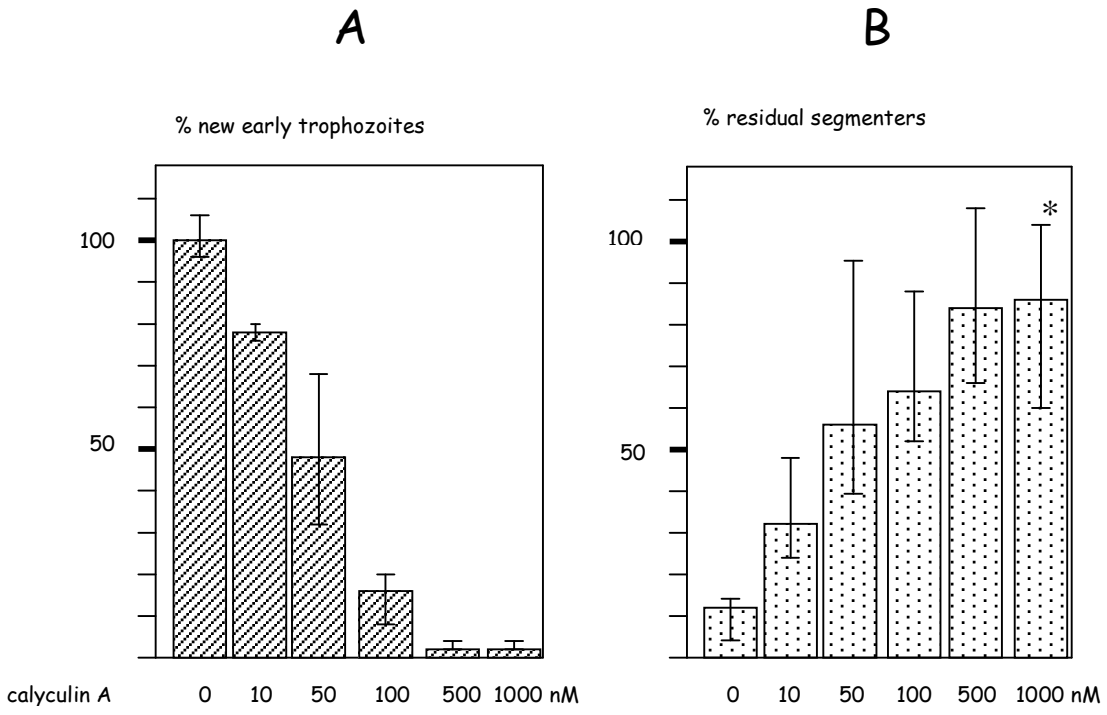


Figure 9


A
B
% new early trophozoites
% residual segmenters
100
50
100
50
*
calyculin A
0
10
50
100
500
1000 nM
0
10
50
100
500
1000 nM

Discussion du manuscrit 2

L'étude de l'interaction entre PfSBP1 et son partenaire érythrocytaire LANCL1 nous a permis de mettre en évidence l'existence de modifications post-traductionnelles de la protéine PfSBP1 qui pourraient être corrélées à son transport intracellulaire et son interaction avec LANCL1. Ainsi, parce que ces modifications post-traductionnelles semblent moduler les propriétés de PfSBP1, nos travaux se sont orientés vers la recherche d'événements de phosphorylation.

Nous avons tout d'abord montré par des expériences de marquage métabolique avec du phosphate de sodium radioactif que PfSBP1 est effectivement phosphorylée *in vivo*. Des colonnes d'affinité constituées de Gallium représentent un outil de choix pour l'étude de protéines phosphorylées : le Gallium interagit spécifiquement avec les protéines acides, dont les protéines phosphorylées, et celles-ci peuvent ensuite être éluées par un excès de phosphate. Seules les formes PfSBP1-H et M ont été retenues sur de telles colonnes d'affinité, indiquant que les deux formes de PfSBP1 de plus haute masse moléculaire sont phosphorylées. Nous avons ensuite cherché à caractériser plus finement les événements de phosphorylation au niveau de PfSBP1. La réalisation d'une expérience de digestion de préparations de fantômes de globules rouges par la protéinase K indique que le domaine amino-terminal de PfSBP1 est phosphorylé. En effet, lorsque des préparations de fantômes érythrocytaires sont soumises à une digestion protéolytique, le domaine amino-terminal de PfSBP1, localisé dans la lumière des structures de Maurer, est protégé de la protéolyse, comme l'atteste sa détection par immunoempreinte ; de façon tout à fait intéressante, les anticorps dirigés contre le domaine amino-terminal de PfSBP1 détectent deux formes protéiques de masses moléculaires légèrement différentes, suggérant que ce domaine est l'objet de modifications post-traductionnelles (voir figure des *supplementary data* du chapitre 3). Une recherche de prédiction *in silico* des résidus phosphorylés a identifié plusieurs sites potentiels, notamment dans le domaine amino-terminal de PfSBP1. La détection, par immunoempreinte utilisant des anticorps dirigés contre les résidus phosphorylés, d'un fragment de digestion tryptique de PfSBP1 de 8,5 kDa montre qu'au moins l'un d'eux est utilisé *in vivo*. Nous nous sommes ensuite intéressés aux enzymes susceptibles de moduler la phosphorylation de PfSBP1. Les logiciels de prédiction des sites d'interaction avec les protéines sérine/thréonine phosphatase de type PP1 ont identifié plusieurs sites potentiels, essentiellement dans le domaine amino-terminal de PfSBP1, qui est orienté dans la lumière

des structures de Maurer. La protéine sérine thréonine phosphatase de type PP1 plasmodiale (PfPP1) a été identifiée par Kumar et collègues, qui ont montré que cette protéine est essentielle pour le parasite. Elle est présente tout au long du cycle érythrocytaire, et en son absence la croissance du parasite est très fortement réduite (Kumar, Adams *et al.* 2002).

Nous avons dans un premier temps étudié la localisation subcellulaire de cette enzyme, en utilisant un anticorps monoclonal dirigé contre la région amino-terminale de la protéine PP1 humaine, région qui est très conservée entre les enzymes humaine et plasmodiale. Nous avons réalisé des expériences de digestion à la protéinase K de préparations de fantômes de globules rouges parasités : des préparations de fantômes de globules rouges sains et parasités ont été soumises à une digestion protéolytique en présence et en absence de détergent. La présence d'une protéine phosphatase PP1 au sein des différents échantillons a ensuite été établie par immunoempreinte. Nous avons tout d'abord constaté qu'une phosphatase PP1 est détectée en association avec les préparations de fantômes de globules rouges sains ; cette protéine est dégradée par un traitement protéolytique, réalisé en l'absence de détergent. Ce résultat indique donc que la phosphatase PP1 humaine est périphérique de la membrane du globule rouge. En revanche, lorsque des préparations de fantômes de globules rouges parasités sont soumises à une digestion protéolytique en l'absence de détergent, les anticorps détectent une phosphatase. La phosphatase est par contre protéolysée en présence de détergent. Cette enzyme est donc localisée dans la lumière de vésicules fermées associées aux fantômes de globules rouges parasités. Or, à ce jour, les seules structures vésiculaires décrites dans les préparations de fantômes de globules rouges parasités sont les structures de Maurer. Ainsi, les structures de Maurer contiennent une phosphatase de type PP1, et nous avons considéré que seule PfPP1, l'enzyme parasitaire, est susceptible d'être adressée à ce compartiment. Par conséquent, seule la phosphatase PP1 parasitaire est susceptible d'interagir avec le domaine amino-terminal de PfSBP1, localisé dans la lumière des structures de Maurer.

De fait, des expériences d'immunoprécipitation réalisées à partir d'extraits de fantômes érythrocytaires ont montré que les protéines PfSBP1 et PfPP1 coimmunoprécipitent, ce qui démontre l'existence d'une interaction entre ces deux protéines. De plus, le traitement de cultures parasitaires avec la calyculine, un inhibiteur spécifique des phosphatases de type PP1 et PP2A, entraîne l'hyperphosphorylation de PfSBP1. Comme l'activité PP2A dans les globules rouges parasités est très faible (Yokoyama, Saito-Ito *et al.* 1998), l'effet de la calyculine peut être attribué à l'inhibition de la phosphatase PP1 et ce résultat confirme que PfSBP1 est bien un substrat de PfPP1. Ce résultat, qui constitue la première mise en évidence

d'événements de phosphorylation et d'une phosphatase au sein des structures de Maurer, suggère que ce compartiment est dynamique, qu'il participe à des processus biologiques finement régulés, et qu'il ne se réduit pas à un compartiment intermédiaire dans le transport de protéines parasitaires vers la membrane érythrocytaire. Il est vrai que l'identification de kinases au sein des structures de Maurer suggérait déjà une telle réalité, mais nous montrons ici que ces kinases sont fonctionnelles, et identifions l'une de leurs cibles, ce qui ouvre de nouvelles perspectives.

Nous avons ensuite cherché à préciser la corrélation,précédemment observée, entre la phosphorylation de PfSBP1 et son interaction avec LANCL1 : LANCL1 est en effet recrutée au niveau des structures de Maurer aux stades tardifs du développement érythrocytaire, et seule la forme PfSBP1-H se lie à LANCL1. Nous avons donc déterminé la quantité relative des différentes formes de PfSBP1 au cours du cycle érythrocytaire : il semblerait que la forme PfSBP1-H, qui interagit avec LANCL1, est très abondante jusqu'à la fin de la maturation des mérozoïtes, puis qu'elle devient moins abondante dans les heures précédant la libération des mérozoïtes. Ce résultat, à supposer qu'il reflète la cinétique de recrutement de LANCL1 au niveau des structures de Maurer, éclaire le rôle possible de l'interaction entre PfSBP1 et LANCL1. En effet, il est tentant de proposer que cette interaction, qui perdure pendant la formation des mérozoïtes, permet de rigidifier la membrane érythrocytaire et d'éviter sa rupture avant la maturation complète des mérozoïtes. Peu avant la libération des mérozoïtes, la déphosphorylation de PfSBP1-H, sous l'action de PfPP1, aurait pour effet de dissocier l'interaction, ce qui fragiliserait la membrane érythrocytaire et faciliterait ainsi sa rupture. Dans cette optique, nous avons étudié l'importance fonctionnelle des phosphatases de type PP1 pour la libération des mérozoïtes en utilisant la calyculine, qui est un inhibiteur spécifique des phosphatases de type PP1 et PP2A. L'activité PP2A dans les globules rouges parasités étant très réduite, l'effet de la calyculine peut être attribué à l'inhibition de la phosphatase PP1 (Yokoyama, Saito-Ito *et al.* 1998). L'inhibition des phosphatases de type PP1 par l'ajout de calyculine au stade schizonte, si elle n'a pas d'effet sur la maturation des mérozoïtes, inhibe en revanche leur libération avec une IC50 de 30 nM environ. Il est vrai que les phosphatases ont généralement un très grand nombre de substrats divers et que nos expériences ne montrent pas formellement que l'effet de la calyculine sur la libération des mérozoïtes est lié à l'absence de déphosphorylation de PfSBP1. Néanmoins, nous avons observé en électrophorèse SDS-PAGE que le traitement avec la calyculine ne modifie pas significativement le profil des protéines retenues sur colonne de Gallium ; de plus, des travaux

antérieurs de Bhattacharyya et collègues ont montré que le traitement de parasites asynchrones avec la calyculine induit l'hyperphosphorylation d'une protéine de 51 kDa, dont nous pensons qu'il pourrait s'agir de PfSBP1 (Bhattacharyya, Hong *et al.* 2002). Cela dit, il n'est pas exclu que d'autres protéines mineures (et de ce fait non détectées) puissent être hyperphosphorylées et responsables du phénotype observé en présence de calyculine. Néanmoins, PfSBP1 semble être le principal substrat de PfPP1, du moins au stade schizonte tardif, et la déphosphorylation de la protéine PfSBP1 semble cruciale pour la libération des mérozoïtes.

Bien évidemment, ces résultats n'excluent pas que PfPP1 participe à d'autres processus cellulaires, notamment à d'autres stades du développement érythrocytaire du parasite. En effet, nos travaux se sont limités au traitement par la calyculine de parasites au stade schizonte très mûr, alors que la calyculine ajoutée à des trophozoïtes bloque leur développement. PfPP1 pourrait en effet exercer d'autres fonctions cellulaires essentielles pendant la première moitié du cycle, comme c'est le cas dans d'autres types cellulaires où la protéine phosphatase de type PP1 exerce des fonctions biologiques très variées, allant du contrôle de la mitose, de l'épissage des ARNm, de la synthèse protéique, à la morphologie des synapses et la contraction du muscle squelettique (Cohen 2002). Cette diversité des substrats et des fonctions de la protéine phosphatase soulève alors la question de la spécificité de la réaction catalysée. En fait, l'activité de la sous-unité catalytique de la PP1 dépend de sa liaison à une sous-unité régulatrice : à ce jour, plus de 50 sous-unités régulatrices ont été identifiées, susceptibles de se lier à la PP1 de façon mutuellement exclusive (Cohen 2002). La liaison à une sous-unité régulatrice donnée confère à la sous-unité catalytique de PP1 sa spécificité de substrat, sa localisation subcellulaire, et sa sensibilité à différents effecteurs enzymatiques. Chez *P. falciparum*, les sous-unités régulatrices des phosphatases sont encore peu connues : un seul gène spécifiant une sous-unité régulatrice de PfPP1 (PFE0455w), et deux gènes spécifiant des sous-unités régulatrices de phosphatases de type PP2 (PF07_0102 et PF14_0492) ont été annotés. Néanmoins, dans la mesure où la protéine PfPP1 complémente la mutation de l'enzyme PP1 chez la Levure *Saccharomyces cerevsisiae* (Bhattacharyya, Hong *et al.* 2002), il est très probable que PfPP1 interagit avec les sous-unités régulatrices de la Levure pour former une holoenzyme fonctionnelle, et que ces protéines sont conservées chez *P. falciparum*. De telles sous-unités régulatrices plasmodiales pourraient être identifiées par des études de chromatographie d'affinité réalisées avec la forme recombinante de PfPP1, qui a la propriété de posséder une activité catalytique (Kumar, Adams *et al.* 2002). Il ne fait

aucun doute que la recherche de sous-unités régulatrices des protéines PP1 au sein du génome de *P. falciparum* permettra de mieux comprendre le fonctionnement de PfPP1 et d'appréhender les différentes fonctions cellulaires qu'elle peut exercer, éventuellement au sein de différents compartiments subcellulaires. Par ailleurs, nous avons évoqué précédemment le cas d'une protéine kinase, PfCDPK1, qui est adressée aux structures de Maurer par une voie de transport atypique, mettant en jeu les *lipid rafts* (Moskes, Burghaus *et al.* 2004). A ce sujet, l'étude de la voie de transport de PfPP1 dans les structures de Maurer s'avère également très intéressante, dans la mesure où cette protéine ne possède pas de Pexel. Ainsi, dans une perspective plus générale, ces travaux illustrent l'importance fonctionnelle de la sérine/thréonine phosphatase de type PP1α, qui n'est certainement pas restreinte à la déphosphorylation de PfSBP1, et ouvrent la porte à de nouvelles analyses du rôle biologique de cette enzyme et de ses éléments régulateurs au cours du cycle biologique de *P. falciparum.*
Par ailleurs, nos études se sont pour l'instant limitées à l'étude de la phosphatase qui interagit avec PfSBP1 au sein des structures de Maurer, mais la question de la nature de la kinase qui phosphoryle PfSBP1 est également très intéressante. L'étude des kinases est rendue difficile par leur très grande diversité : à ce jour, on évalue à 65 le nombre de protéines kinases de *P. falciparum* (Ward, Equinet *et al.* 2004). Le nombre exact de phosphatases spécifiées par *P. falciparum* n'est pas connu : si un seul gène spécifiant une phosphatase de type PP1 a été caractérisé, en revanche plusieurs gènes spécifiant des phosphatases, pour la plupart putatives, ont été annotés. Mais l'annotation de gènes ne signifie pas que les enzymes sont actives : en dépit de l'identification de gènes spécifiant des phosphatases PP2 putatives au sein du génome de *P. falciparum* (Garcia, Cayla *et al.* 1999), l'activité PP2 est soit absente soit extrêmement marginale chez le parasite (Yokoyama, Saito-Ito *et al.* 1998). Ainsi, selon les organismes, le ratio entre le nombre de sérine/thréonine phosphatases et le nombre de sérine/thréonine kinases est d'environ 1:10 chez l'Homme et de 1:6 chez la drosophile (Cohen 2002). Néanmoins, comme nous l'avons mentionné précédemment, le petit nombre de phosphatases est compensé par la très grande diversité de leurs sous-unités régulatrices. Les études du kinome de *P. falciparum* ont mis en évidence un certain nombre de différences structurales entre les kinases plasmodiales et celles des vertébrés, et notamment de l'Homme (pour revue (Doerig 2004)). Il existe même chez *P. falciparum* une famille de kinases qui n'est pas conservée chez l'Homme : les *Calcium Dependant Protein Kinases*, dont l'une d'entre elles, la PfCDPK1, est localisée dans les structures de Maurer. De plus, il est très courant qu'une protéine kinase parasitaire exerce une fonction biologique très différente de son homologue

humaine (Doerig 2004). Ainsi, les auteurs pensent que la distance phylogénétique entre le parasite et son hôte a des répercutions suffisamment fortes sur l'ensemble des kinases et de leurs fonctions biologiques chez *P. falciparum* pour permettre de considérer que l'inhibition sélective des kinases parasitaires est possible, et que, à ce titre, les kinases de *P. falciparum* constituent des cibles thérapeutiques de tout premier intérêt (Doerig 2004).
Ainsi, l'étude des modifications post-traductionnelles de la protéine PfSBP1 a mis en évidence l'existence d'événements de phosphorylation au sein des structures de Maurer et ouvre des perspectives d'étude beaucoup plus larges que la seule étude de son rôle biologique.

Discussion générale et conclusion du chapitre 1

Les travaux que nous avons décrits dans ce chapitre étaient au départ centrés sur la poursuite de la caractérisation de la protéine transmembranaire des structures de Maurer, PfSBP1, qui avait été initiée au laboratoire. Les premières études avaient mis en évidence une interaction protéique entre le domaine cytoplasmique de PfSBP1 et une protéine érythrocytaire, interaction dont nous pensions qu'elle était responsable de l'association des structures de Maurer à la membrane érythrocytaire.
Nous avons pu identifier son partenaire érythrocytaire comme étant la protéine LANCL1, dont il est proposé, au vu de son homologie avec les protéines Lanc bactériennes, qu'elle appartient à un complexe enzymatique membranaire participant à la synthèse de peptides modifiés aux propriétés antimicrobiennes. Nous avons de plus précisé que cette interaction est restreinte aux stades tardifs du développement érythrocytaire de *P. falciparum*, invalidant ainsi l'hypothèse de départ. En revanche, nous avons constaté à cette occasion l'existence de modifications post-traductionnelles de PfSBP1, corrélées à son interaction avec LANCL1. Nous avons donc entrepris de caractériser ces modifications : il s'agit de phosphorylations qui sont abondantes sur la fin de cycle, mais décroissent au moment de la libération des mérozoïtes. Nos travaux ont par ailleurs mis en évidence la présence d'une protéine phosphatase parasitaire de type PP1 au sein des structures de Maurer, qui coimmunoprécipite avec PfSBP1 : il est probable que la phosphorylation de PfSBP1 soit modulée par la phosphatase PfPP1. Nous proposons alors un modèle plus précis quant au rôle de l'interaction entre PfSBP1 et LANCL1 : la forme phosphorylée de PfSBP1 recrute LANCL1, protéine périphérique de membrane, ce qui a pour effet de rigidifier la membrane érythrocytaire et

d'éviter sa rupture précoce. Lorsque les mérozoïtes ont atteint un certain degré de maturité, PfSBP1 est déphosphorylée et n'interagit plus avec LANCL1. La membrane érythrocytaire, n'étant plus solidifiée par cette interaction, se rompt plus facilement, libérant ainsi les mérozoïtes infectieux. L'utilisation d'un inhibiteur de PfPP1 a conforté ce modèle : l'ajout de calyculine entraîne une hyperphosphorylation de PfSBP1 et inhibe la libération des mérozoïtes. Des études de mutagenèse dirigée des sites d'interaction de PfSBP1 avec LANCL1 et PfPP1 permettraient d'établir formellement un lien entre le niveau de phosphorylation de PfSBP1 et son interaction avec LANCL1.

Par ailleurs, des expériences réalisées chez d'autres espèces plasmodiales suggèrent que cette interaction est conservée, en particulier chez *Plasmodium berghei* (Yuthavong and Limpaiboon 1987). En effet, les auteurs ont identifié chez *P. berghei* une protéine de 43 kDa (M43) associée aux préparations de fantômes de globules rouges parasités dont la phosphorylation est corrélée avec une stabilité membranaire accrue. De plus, le niveau de phosphorylation de M43 diminue lors de la maturation des mérozoïtes. Il est alors très tentant de proposer, en se fondant sur l'ensemble de ces données, que M43 est l'homologue de PfSBP1 chez *P. berghei*. Cette hypothèse est corroborée par le fait que les anticorps dirigés contre PfSBP1 interagissent avec des compartiments similaires aux structures de Maurer chez *P. berghei* et *P. chabaudi*, et reconnaissent en immunoempreinte une protéine de 43 kDa. Il serait intéressant de savoir si la protéine M43 interagit avec une protéine murine orthologue de LANCL1, sachant qu'une telle protéine a été décrite chez la souris et le rat (Mayer, Breuss *et al.* 1998; Mayer, Bauer *et al.* 2001).

Dans une perspective beaucoup plus générale, ces travaux ouvrent la voie à l'étude des kinases et phosphatases exportées hors du parasite, notamment dans les structures de Maurer, et des voies de signalisation auxquelles elles participent. La mise en évidence d'événements de phosphorylation au sein des structures de Maurer et l'identification de PfPP1 dans ce compartiment suggèrent que les structures de Maurer exercent d'autres fonctions biologiques que le simple transport de protéines vers la membrane érythocytaire. Les structures de Maurer pourraient en particulier participer à la transduction de signaux extérieurs, que le parasite pourrait recevoir par exemple en réponse à l'interaction de la surface érythrocytaire avec un anticorps de l'hôte, ou à la cytoadhérence des globules rouges parasités aux cellules endothéliales. Nous aurons l'occasion de revenir, dans le chapitre 3, sur cette diversité des rôles biologiques auxquels les structures de Maurer pourraient participer.

Chapitre 2 : Analyse protéomique fonctionnelle des fantômes de globules rouges parasités, appliquée aux hydrolases à sérine

Introduction

Le succès des thérapies à base d'inhibiteurs de protéases dans le traitement du SIDA au cours de la dernière décennie illustre le fait que les protéases constituent des cibles thérapeutiques de choix. Ce succès tient probablement à ce que les protéases participent à de nombreux processus cellulaires : dégradations cataboliques, protéolyse des facteurs contrôlant la progression dans le cycle cellulaire, contrôle de qualité des protéines à la sortie du reticulum endoplasmique, activation d'enzymes et d'hormones… Certaines maladies humaines, comme l'hypertension et la maladie d'Alzheimer sont liées à l'activation d'une protéase endogène ; le traitement s'avère alors délicat, dans la mesure où l'inhibition d'une protéase humaine peut avoir de sérieux effets secondaires. En revanche, les protéases des agents pathogènes constituent des cibles thérapeutiques très intéressantes, dans la mesure où la différence de structure entre l'enzyme de l'hôte et de l'agent pathogène peut permettre d'inhiber spécifiquement cette dernière. Les protéases de *P. falciparum* ont fait l'objet de nombreuses études de caractérisation et de recherche d'inhibiteurs. En effet, chez le parasite, les protéases participent à plusieurs étapes essentielles au développement érythrocytaire, dont l'invasion de la cellule hôte, la dégradation de l'hémoglobine, et la libération des mérozoïtes hors du globule rouge parasité .

Les protéases participant à l'invasion de la cellule hôte par les mérozoïtes peuvent intervenir en amont de l'étape d'invasion, en participant à la maturation protéolytique de protéines de

surface du mérozoïte qui servent de ligand lors de l'interaction avec la membrane érythrocytaire. Ainsi, les protéines AMA-1 (*Apical Membrane Antigen 1*) et MSP-1 (*Merozoite Surface Protein 1*), associées à la membrane du mérozoïte, subissent une maturation protéolytique indispensable au processus d'invasion (Blackman, Whittle *et al.* 1991; Blackman, Dennis *et al.* 1996; Howell, Withers-Martinez *et al.* 2001). Chez les organismes eucaryotes, ce sont généralement les sérylprotéases de la classe des subtilisines, aussi appelées pro-protéine convertases, qui assurent la maturation de protéines, soit dans l'appareil de sécrétion, soit dans le milieu extracellulaire. Trois subtilisines ont été identifiées au sein du génome de *P. falciparum*, dont deux sont très étudiées (PfSUB1 et PfSUB2) ; elles pourraient participer à la maturation des protéines de surface du mérozoïte, et plus généralement au processus d'invasion (Blackman, Fujioka *et al.* 1998; Barale, Blisnick *et al.* 1999; Hackett, Sajid *et al.* 1999). Par ailleurs, l'invasion proprement dite de l'érythrocyte par le mérozoïte induit une réorganisation du réseau de spectrine et d'actine sous-membranaire de l'érythrocyte (Aikawa, Miller *et al.* 1981), qui met probablement en jeu des activités protéases. Ainsi, la sérylprotéase Pfgp76, qui est sécrétée par le mérozoïte lors de l'invasion est capable de cliver les boucles externes de la bande 3 (Roggwiller, Betoulle *et al.* 1996).

La dégradation de l'hémoglobine a lieu dans la vacuole digestive, et requiert également un certain nombre d'activités enzymatiques, qui agissent selon une cascade semie ordonnée. Le clivage de l'hémoglobine est initié par des aspartylprotéases (les plasmepsines), continue sous l'action conjointe de ces enzymes et de protéases à cystéine de la famille des papaïnes (les falcipaïnes), et s'achève avec la digestion par des métalloprotéases (les falcilysines) et une aminopeptidase cytosolique (Bray, Janneh *et al.* 1999; Gavigan, Dalton *et al.* 2001; Banerjee, Liu *et al.* 2002), et pour revue (Rosenthal 2004). Toutes ces enzymes ont fait l'objet d'études approfondies, et l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques a des répercussions sur la croissance *in vitro* de *P. falciparum*. Néanmoins, des études récentes de disruption des gènes spécifiant ces enzymes suggère une certaine redondance fonctionnelle (Banerjee, Liu *et al.* 2002; Rosenthal, Sijwali *et al.* 2002; Liu, Gluzman *et al.* 2005), qui nécessite la mise au point d'inhibiteurs à spectre relativement large, d'autant plus que l'analyse du génome a identifié des gènes polymorphes spécifiant plusieurs falcipaïnes et falcilysines.

La libération des mérozoïtes hors du globule rouge parasité met en jeu plusieurs activités enzymatiques : le processus est sensible à des inhibiteurs de protéases (sérine, cystéine et aspartylprotéases) et de phospholipases (Hadley, Aikawa *et al.* 1983; Lyon and Haynes 1986; Roggwiller, Fricaud *et al.* 1997; Roggwiller, Blisnick *et al.* 1998; Salmon, Oksman *et al.*

2001) (Wickham, Culvenor *et al.* 2003). Comme nous l'avons expliqué dans l'introduction, plusieurs protéases parasitaires susceptibles de participer à la libération des mérozoïtes ont été identifiées. Il s'agit notamment d'une aspartylprotéase, la plasmepsine II, et de la falcipaïne 2, une cystéine protéase (Le Bonniec, Deregnaucourt *et al.* 1999; Dua, Raphael *et al.* 2001; Hanspal, Dua *et al.* 2002) ; ces deux enzymes clivent des protéines du squelette sous-membranaire, ce qui aurait pour effet de déstabiliser la membrane érythrocytaire et de favoriser sa rupture (Dhawan, Dua *et al.* 2003). Néanmoins, des études de disruption génique de la falcipaïne 2 indiquent que le phénotype des parasites déficients en falcipaïne 2, très affecté au stade trophozoïte jeune, redevient normal aux stades tardifs du développement érythrocytaire (Sijwali and Rosenthal 2004). Cela suggère qu'il existe une certaine redondance fonctionnelle entre les falcipaïnes, notamment entre les falcipaïnes 2 et 3 [Sijwali, 2004 #947]. De plus, la rupture de la membrane érythrocytaire est également sensible aux inhibiteurs de sérylprotéases, ce qui suggère que toutes les enzymes participant à la libération des mérozoïtes ne sont pas encore identifiées. Les protéines spécifées par la famille multigénique SERA (S*erine Repeat Rich Antigens*) sont des protéases putatives qui pourraient être impliquées dans ce processus. Il s'agit d'une famille de neuf protéines dont l'organisation générale évoque les enzymes de la famille des papaïnes, mais dont le site actif de six d'entre elles (SERA1 à 5 et SERA9) contient un résidu sérine, et non pas cystéine. Elles sont exportées dans la vacuole parasitophore et le *tubovesicular membrane network*. Des études de disruption génique ont montré que seules certaines de ces protéines sont essentielles au développement du parasite (Miller, Good *et al.* 2002). A ce jour, seule l'activité protéolytique de l'une d'entre elles, SERA5, a été caractérisée (Hodder, Drew *et al.* 2003) ; sa spécificité de clivage, en aval des résidus tyrosine, suggère qu'il s'agit d'une activité de type chymotrypsine. Son profil de sensibilité aux inhibiteurs de protéases est intéressant : en dépit de son homologie avec les cystéine protéases de la famille des papaïnes, elle est sensible à un inhibiteur de sérylprotéases, la 3,4-diisocoumarine, mais pas à un autre, le phénylméthylsulfonyl fluoride.

Au cours du travail que nous décrivons dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à ces sérylprotéases participant à la libération des mérozoïtes. Parce que l'activité de ces enzymes est généralement régulée par des modifications post-traductionnelles, les méthodes d'étude classiques qui sont fondées sur la détection des protéines conviennent mal à leur analyse fonctionnelle. Nous avons donc suivi une approche protéomique fonctionnelle, en utilisant la FP-biotine (Liu, Patricelli *et al.* 1999). Il s'agit d'un outil moléculaire formé de l'association

d'un groupement fluorophosphonate avec une molécule de biotine. Le fluorophosphonate et ses composés dérivés ont la propriété d'inhiber les hydrolases à sérine en se liant à leur site catalytique, mais uniquement si celui-ci est fonctionnel. L'intérêt du couplage avec une molécule de biotine réside dans le fait qu'il permet ensuite de purifier les enzymes marquées par la FP-biotine, grâce à l'affinité de la biotine pour l'avidine (Kidd, Liu *et al*. 2001). Leur analyse par spectrométrie de masse permet ensuite leur identification. Les études préliminaires de validation de la FP-biotine, réalisées avec des échantillons de testicule de rat, ont montré qu'il est effectivement possible de purifier spécifiquement des hydrolases à sérine à partir d'échantillons protéiques complexes (Kidd, Liu *et al*. 2001). Même si la famille des hydrolases à sérine ne se réduit pas aux protéases, mais inclut également des lipases, estérases, amidases et transacylases, nous avons considéré que la FP-biotine constitue un outil adapté à l'étude des protéases impliquées dans la libération des mérozoïtes. Il est par ailleurs important de souligner que les enzymes que nous souhaitons étudier, qui dégradent la membrane érythrocytaire, sont probablement exportées hors du parasite, dans le cytoplasme du globule rouge. L'activation de processus protéolytiques au sein du cytoplasme du globule rouge doit être finement régulée, et il est tentant de proposer que les structures de Maurer, qui constituent un compartiment membranaire dans le cytoplasme du globule rouge, pourraient servir de citernes de stockage. Nous avons donc décidé de restreindre notre analyse aux seules préparations de fantômes d'érythrocytes infectés, afin de diminuer la complexité de l'échantillon d'une part, mais aussi et surtout dans le but de mieux caractériser le rôle des structures de Maurer dans la libération des mérozoïtes.

Dans le manuscrit en préparation présenté ci-après, nous récapitulons les résultats de notre étude, qui a permis de mettre en évidence un certain nombre d'activités sérylhydrolases spécifiquement associées aux préparations de fantômes de globules rouges parasités. Nous avons tenté de les purifier, et avons ainsi identifié l'une d'entre elles comme étant la protéine RhopH2, initialement décrite comme étant localisée dans les rhoptries. Nous avons alors analysé plus finement sa localisation subcellulaire, et tentons à présent de caractériser son activité sérylhydrolase.

Manuscrit 3 : Proteomic analysis identifies RhopH2 as a putative serine hydrolase of the Maurer's clefts, a secretory compartment delivering *Plasmodium falciparum* proteins to the surface of its host cell.

Proteomic analysis identifies RhopH2 as a putative serine hydrolase of the Maurer's clefts, a secretory compartment delivering *Plasmodium falciparum* proteins to the surface of its host cell.

Laetitia VINCENSINI[1], Thierry BLISNICK[1], Sophie RICHERT[2], Emmanuelle LEIZE-WAGNER[2], Alain VAN DORSSELAER[2], Benjamin F. CRAVATT[3] and Catherine BRAUN BRETON[1, 4]*.

[1] Unité de Biologie des Interactions Hôte-Parasite, CNRS URA 2581 Institut Pasteur, 25-28 Rue du Dr Roux 75015 Paris, France,[2] Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique, 25 rue Becquerel, 67087 Strasbourg Cedex 2, France, [3] The Skaggs Institute for Chemical Biology and Department of Cell Biology, The Scripps Research Institute, 10550 North Torrey Pines Road, La Jolla, California 92037, USA, [4] UMR 5539 CNRS-Université Montpellier 2 Place Eugène Bataillon 34095 Montpellier Cedex 5, France.

* to whom correspondence should be addressed. Tel: (33) 4 67 14 33 81; Fax: (33) 4 67 14 42 86; E-mail: cbb@univ-montp2.fr

Running title: New roles for the RhopH complex ?

Key words: malaria parasite, serine hydrolase , Maurer's clefts, merozoite release, rhoptries, protein export.

Abstract

Enzymatic activities involved in the release of *Plasmodium falciparum* merozoites from the infected erythrocyte constitute interesting drug targets. In this paper we have searched for such enzymes, using a biotinylated fluorophosphonate, FP-biotin, that interacts specifically with the active sites of serine hydrolases and allows their purification. Because enzymes involved in parasite egress from its host cell are likely exported near the erythrocyte membrane, we have probed *P. falciparum*-infected erythrocyte ghost preparations, which contain the erythrocyte plasma membrane and sub-membrane skeleton together with the Maurer's clefts, a Golgi like secretory compartment transposed by *P. falciparum* in the cytoplasm of its host cell. We report the identification of RhopH2, a protein previously assigned to the rhoptries as a member of the RhopH complex. We establish that a fraction of the RhopH complex is exported to the Maurer's clefts, where it could participate in the assembly of the cytoadherence complex.

Introduction

Malaria still represents a major threat to public health in the developing tropical countries, where most of the 500 million cases occur each year, leading to 1-2 million deaths (1). With the selection of insecticide-resistant vectors and drug-resistant parasites, new antimalarial drugs are urgently needed. In the last decade, the efficiency of anti-protease treatment against the HIV virus has highlighted the potential of these enzymes as drugs targets. Interestingly, proteases have been shown to participate in many essential processes during the erythrocyte development of *Plasmodium falciparum*, such as erythrocyte invasion, digestion of haemoglobin, and parasite release from the host cell. Whereas enzymes participating in the two former processes have been relatively well characterised (2-11), there is only limited knowledge of the proteases participating in parasite egress from the host cell, despite the fact that this process is greatly affected by cysteine and serine protease inhibitors (12-15). A few enzymes have been proposed to be implicated in schizont rupture, including the aspartate protease plasmepsin II and the cysteine protease falcipain-2, which both degrade erythrocyte skeleton proteins (16-18). The putative serine proteases of the SERA family, which are exported to the parasitophorous vacuole are also candidates of interest (19). Recent studies established that lysis of the parasitophorous vacuole and the erythrocyte membranes occurs in this order, involving two successive proteolytic steps (20). Based on their inhibitor sensitivity, these processes are likely to require different enzymatic activities: while the parasitophorous vacuole membrane lysis is inhibited by cysteine protease inhibitors, the erythrocyte membrane rupture is sensitive to cysteine, aspartate as well as trypsin-like serine protease inhibitors (20). In this paper, we report a functional and proteomic approach that we have developed in order to identify new protease candidates involved in parasite egress from its host cell. Our study focused on infected erythrocyte ghost preparations (21), that contain the erythrocyte plasma membrane and sub-membrane skeleton together with the Maurer's clefts, a

Golgi like secretory compartment transposed by *P. falciparum* in the cytoplasm of its host cell and trafficking parasite proteins to the red cell membrane (22-26); indeed, these enzymes are likely to be exported near the red blood cell membrane, possibly *via* the Maurer's clefts. We have probed infected erythrocyte ghost preparations with FP-biotin, a biotinylated fluorophosphonate which specifically interacts with the active sites of serine hydrolases and allows specific protein purification from complex proteomes (27). In this paper we report the identification of RhopH2, a protein of the RhopH complex that was initially described as a rhoptry protein.

Results

1-Serine hydrolases associated with infected red blood cell ghost preparations; identification of the rhoptry protein RhopH2.

Uninfected and infected erythrocyte ghost preparation extracts, either with (Fig.1 lane H) or without (Fig.1 lane NH) a preheating step, were incubated with FP-biotin, a specific probe of the active sites of serine hydrolases, and the biotin labelling was revealed by blotting with horse radish peroxidase-conjugated avidin (Experimental Procedures). Only proteins showing heat-sensitive FP-biotin reactivity were considered as specific targets. Very few bands were detected in association with uninfected red blood cell ghost preparations (Fig.1 lane NH); the strongest band is indicative of a molecular mass of 60 kDa, and was also detected in the lane corresponding to infected erythrocyte ghosts, where it appears fainter. This is probably due to the fact that the amounts of proteins loaded in each sample are equal, which implies that in proportion erythrocyte proteins are less abundant in the infected red blood cell ghost sample. Several other bands were specifically detected in association with the parasitised ghost preparations, mainly in the 50 to 90 kDa molecular mass range. Only three of these bands (the molecular masses of which are 300, 250 and 50 kDa) were also detected in the infected erythrocyte ghost sample that was preheated before its incubation with FP-biotin (Fig.1 lane H), and correspond to unspecific labelling. Overall, several proteins are specifically labelled with FP-biotin in infected *versus* uninfected erythrocyte ghost preparation, and they do not correspond to background labelling. These proteins, which are arrowed on Fig.1, are parasite derived serine hydrolase candidates; they were thus purified by incubation with avidin-agarose beads (Experimental Procedures). A fraction of the eluate was analysed by SDS-PAGE and silver stained (Fig.2A, lane 2). A sample preheated prior to incubation with FP-biotin was run in parallel as a negative control (Fig.2A, lane 1). Many proteins whose molecular mass is between 100 and 250 kDa are highly enriched and specific of the eluate

fraction, while other proteins appear as fainter bands in the 80-90 kDa region of the gel. Unfortunately, only two of these specific bands, of 160 and 140 kDa (arrowed 1 and 2, Fig.2A) could be seen on the preparative gel, which was stained with Bio-Safe Coomassie. Despite the fact that FP-biotin labelling of these bands was extremely faint in the previous blotting experiment, we decided to excise them from the gel and to characterise them further. They were processed by tandem mass spectrometry. While analysis of the 160 kDa band yielded no known peptides, 11 peptides matching to the RhopH2 protein (High molecular mass rhoptry protein 2) were identified from the 140 kDa band (Fig.2B). This result unambiguously identifies the protein contained in this band as the parasite-derived protein RhopH2. RhopH2 has been previously described as a rhoptry protein; it is a 1364 residue protein, whose predicted molecular mass is 140 kDa; it has a predicted transmembrane domain between residues 736 and 769. RhopH2 is part of the high molecular mass rhoptry protein complex, called RhopH, that is composed of three polypeptides with estimated sizes of 155 kDa (RhopH1), 140 kDa (RhopH2) and 110 kDa (RhopH3) (28), encoded by distinct genes (29-31). Nothing is known about its function, but the RhopH complex is nevertheless considered to be critical for erythrocyte invasion, as it binds the erythrocyte and distributes into the erythrocyte and parasitophorous vacuole membranes (32-34). It has been suggested that insertion of rhoptry components such as RhopH may cause expansion and invagination of the erythrocyte membrane to form the parasitophorous vacuole membrane.

2- Subcellular localisation of RhopH2.

Because ghost preparations are not detectably contaminated by the parasitophorous vacuole (21, 35), the detection of RhopH2, a rhoptry protein deposited to the parasitophorous vacuole membrane upon red cell invasion, is intriguing. RhopH2 has been previously described as a rhoptry protein, its identification within infected red blood cell ghost preparations is intriguing. We raised mouse antibodies against the aminoterminal domain of RhopH2

expressed as a GST-fusion recombinant protein (Experimental Procedures). The resulting polyclonal serum was validated by Western blot and immunofluorescence experiments (Figs.3 and 4). A protein of the expected size (140 kDa) is detected in whole cell lysates of parasite infected erythrocytes (Fig.3, lane 1), but not in uninfected erythrocyte lysates (Fig.3, lane 3). The pre-immune serum did not react with erythrocyte or parasite proteins (not shown). Moreover, the immunofluorescence pattern is characteristic of a rhoptry protein composed of double dots at the apex of the nuclei in mature schizonts (Fig.4 panel C), which is deposited to the parasitophorous vacuole following red cell invasion (Fig.4 panel A).

Interestingly, while synthesis of endogenous RhopH proteins begins at the mature trophozoite stage and persists during schizogony (28), the RhopH2 protein is present throughout the erythrocytic development of the parasite, as shown by Western blotting of total infected erythrocyte extracts prepared from different time points of a synchronous culture (13 to 48 h post invasion) (Fig.5). This indicates that the merozoite-acquired RhopH complex persists at least until the mature trophozoite stage.

The RhopH2 specific serum was further used to precise the subcellular localisation of RhopH2 and confirm its association with the ghost fraction. As shown in Fig.3 lane 2, RhopH2 is detected in the ghost preparation from *P. falciparum* infected erythrocytes. Moreover, following proteinase K digestion of ghost preparations, the RhopH2 specific antibodies reacted with an 80 kDa degradation product, indicating that the carboxyterminal domain of RhopH2 (Met_{769}-Lys_{1364}) is accessible and sensitive to proteinase K digestion (Fig.6 lane 3). When Triton X-100 was added together with proteinase K (Fig.6 lane 4), the protein was not detected, indicating that its aminoterminal domain is also sensitive to proteolysis, but is only accessible following detergent-induced rupture of the Maurer's clefts. Indeed, the Maurer's clefts are the only parasite-derived membrane structures identified in ghost preparations, and they form closed vesicles following hypotonic lysis of infected erythrocytes

(21). Immunofluorescence studies gave results concordant with the localisation of a fraction of the RhopH2 protein in the Maurer's clefts. Indeed, in addition to a diffuse labelling around the parasite nucleus, a punctate pattern typical of Maurer's clefts (21, 35) is observed in the erythrocyte cytosol of mature trophozoites (Fig.4 panel B).

As RhopH2 has been reported to be inserted into the newly formed parasitophorous vacuole membrane upon invasion of a new red blood cell, this raises the question whether the protein that is detected in the Maurer's clefts has been acquired from the merozoite or is newly synthesised and exported by the parasite. In order to address this question, a synchronised culture of young trophozoites was metabolically labelled for 18 h, using [^{35}S]-methionine; mature trophozoites were harvested by Plasmion flotation, and ghosts were prepared. The RhopH2 specific antibodies immunoprecipitate a metabolically labelled 140 kDa protein (Fig.7 lane 2), indicating that the protein that is associated with the ghost fraction is indeed synthesised during the erythrocytic development and exported to the red blood cell cytoplasm, and not retained from the merozoite. The RhopH2 specific antibodies also immunoprecipitate a 150 and 110 kDa protein, both from ghost and total infected erythrocyte extracts (Fig.7 lanes 1 and 2). As proteins of the RhopH complex coimmunoprecipitate (36), these proteins are likely to be RhopH1 and RhopH3 respectively, and this finding is consistent with previous studies showing that the RhopH complex is formed as early as the mature trophozoite stage (36).

Discussion

FP-biotin has been reported as a specific probe of serine hydrolase active sites that allows specific enzyme characterisation and purification from complex proteomes (27). In this study, we used FP-biotin to investigate the serine hydrolases associated with infected red blood cell ghost preparations, because such enzymes could be located in the Maurer's clefts and participate in merozoite release or other essential mechanisms for the parasite development. Several parasite-derived proteins interacting with FP-biotin were detected by peroxidase-conjugated avidin blotting; they interacted with FP-biotin in a heat-sensitive manner, and were thus considered as specific targets. We purified these proteins on avidin-agarose beads. Surprisingly, most proteins detected by blotting, whose molecular masses range from 50 to 90 kDa, were poorly enriched after the purification step; alternatively, proteins of higher molecular mass (from 100 to 300 kDa) were very faintly detected by blotting but highly enriched. Only the latter were abundant enough to be visible after coomassie staining of the preparative gel, and two bands, corresponding to proteins of 160 and 140 kDa, were thus excised from the gel and processed by tandem mass spectrometry. While analysis of the 160 kDa band failed to identify a protein, the 140 kDa protein was unambiguously identified as the parasite-derived rhoptry protein RhopH2. The identification of RhopH2 is reliable because of the number of identified peptides (11/14), and the 7 % coverage of the 1364 amino acid RhopH2 sequence.

Sequence similarity searches failed to identify typical serine hydrolase motifs in the RhopH2 sequence. Interestingly, RhopH1 has been similarly identified following FP-biotin labelling of a *P. falciparum* merozoite extract (unpublished data), suggesting that the RhopH complex might display serine hydrolases activities. However, for both proteins, the available specific antibodies failed to immunoprecipitate an FP-biotin labelled protein. This lack of immunoprecipitation could be due to the fact that the FP-biotin molecule interferes with

antigen recognition. Therefore the serine hydrolase activity of the RhopH2 and RhopH3 proteins should be further investigated.

Previous studies have located the RhopH2 protein in the rhoptries of the malaria parasite, which constitute, along with dense granule and micronemes, specialised organelles of Apicomplexan parasites that are present at the invasive stages of the parasite. In *P. falciparum* merozoites, rhoptries are present as a pair of electron dense pear-shaped organelles, that occupy nearly one third of the volume of the cell. Their protein and lipid contents are discharged when the merozoite invades a red blood cell (37), and are probably involved in the establishment of the parasite infection (34). Upon merozoite invasion, the proteins secreted from the rhoptries are either inserted in the parasitophorous vacuole membrane or located in the parasitophorous vacuole. More precisely, the RhopH2 protein has been described as belonging to the high molecular mass protein complex RhopH, that is composed of three non-covalently associated polypeptides, RhopH1, RhopH2, and RhopH3, encoded by distinct genes (28, 36). While RhopH2 an RhopH3 are encoded by single-copy genes (29, 31), RhopH1 has been shown to be encoded by more than one *clag* gene (30, 38). The RhopH complex is transferred intact to the ring-stage infected red blood cell, where RhopH2 has been identified within detergent-resistant membrane rafts of the parasitophorous vacuole membrane (34). It thus appears that the RhopH complex could contribute to the establishment of the plasmodial vacuole; however, its exact function is still unknown.

In order to characterise the subcellular localisation of RhopH2, specific antibodies were raised, directed against the aminoterminal domain of this protein. The antibodies recognised by Western blotting a protein of the expected size (140 kDa) both within total lysates and ghost extracts of *P. falciparum*-infected erythrocytes. The association of RhopH2 with closed vesicles in infected erythrocyte ghosts prepared from mature trophozoites was assessed by proteinase K digestion experiments. The aminoterminal domain was protected from

proteolysis in the absence of detergent, indicating its location within closed membrane structures; alternatively, it was totally degraded when proteolytic digestion was performed in presence of detergent, indicating its sensitivity to enzymatic degradation. As the Maurer's clefts are the only closed vesicles associated with infected erythrocyte ghost preparations that have been reported, we conclude that at least a fraction of the RhopH2 protein is exported to the Maurer's clefts, at the mature trophozoite stage. Immunofluorescence experiments were performed to confirm the subcellular location of RhopH2. The pattern observed on methanol/acetone fixed mature schizonts further validates our RhopH2 specific antibodies: the double dots located at the apex of the nuclei are characteristic of a rhoptry protein (39). Moreover, the RhopH2 labelling of mature trophozoites confirms that even if most of the protein remains within the parasite, a fraction of the protein is exported to the red blood cell cytosol, where a punctate pattern typical of the Maurer's clefts is observed (21, 35). To address this question further, colocalisation studies with a Maurer's clefts protein and electron microscopy should be performed. Unfortunately, no labelling was detected in association with infected erythrocyte ghost preparations, presumably due to protein loss during preparation, as labelling in the erythrocyte cytosol of intact trophozoites was faint. We assume that the detection of RhopH2 by Western blot within ghost preparations reflects the higher sensitivity of the specific antibodies with this immunodetection method. In any case, because the RhopH complex is reported to be assembled shortly after protein synthesis (36), this finding is consistent with previous studies indicating that the RhopH3 protein is mainly located in the cytosol of trophozoite stage parasites, but that a fraction of the protein is exported to membrane structures in the erythrocyte cytoplasm (32, 40).

However, these studies do not enable to distinguish the newly synthesised from the merozoite-acquired protein. Indeed, we show that the RhopH2 protein is present throughout the parasite erythrocytic development. The RhopH complex is known to be transferred to the

newly invaded erythrocyte, where it persists as an intact complex during at least 18 h; endogenous synthesis of proteins of the RhopH complex begins at the mature trophozoite stage, 32 to 36 h post invasion, and persists during schizogony (28, 36). Our results suggest that the merozoite-derived RhopH complex does persist longer than 18 h, at least until the mature trophozoite stage. In order to determine whether the RhopH2 protein that is detected in ghost preparations is newly synthesised or is only a remnant of merozoite proteins, a culture of young trophozoites was metabolically labelled, harvested at the mature trophozoite stage, and immunoprecipitation experiments were performed. Consistent with previous studies, the RhopH2 specific antibodies immunoprecipitated three labelled proteins from total erythrocyte extracts of this culture, whose molecular masses (150, 140, and 110 kDa) are indicative of the three RhopH proteins (36). Interestingly, the same proteins were immunoprecipitated from a ghost extract prepared from the same culture. This result clearly indicates that a certain proportion of the newly synthesised RhopH complex is exported to the red blood cell cytoplasm at the mature trophozoite stage, prior to schizogony. In regard to the intensity of radioactivity detected in association with each sample, the proportion of exported RhopH complex is fairly low: despite the fact that three times as many cells were used for the ghost extract as for total extracts (Figure legends), the lane corresponding to total extracts was exposed only for 6 days, whereas ghost extracts were exposed for one month. This result does not exclude that part of the RhopH complex inherited from the invading merozoite is also persisting and located in the Maurer's clefts. Noteworthy, the RhopH2 sequence possesses an atypical Pexel export element (K_{158}YLLD)(41). It is also the case for the three RhopH1 sequences that have been described, Clag3.1, Clag3.2, and Clag9 (K_{50}LLNE, K_{77}LILE, and K_{81}ILNE respectively) (30).

The finding that rhoptry proteins are exported to the red blood cell cytoplasm and the Maurer's clefts raises the question of their function within this compartment. Indeed, export to

the red blood cell cytoplasm is not known as an intermediate step in rhoptry targeting, as proteins are trafficked to the rhoptries *via* the classical secretory pathway (42, 43). It is thus tempting to speculate that the exported fraction of the RhopH complex has a specific, and possibly different, function within the Maurer's clefts. As the RhopH1 protein has been identified as the product of three or more *clag* genes (30, 38), the function of this complex could depend on the sequence of the RhopH1 protein that it contains. Interestingly, the *clag* genes were previously described as having a role in cytoadherence (44), and this is consistent with the reported implication of the Maurer's clefts in the assembly of the cytoadherence complex. We thus hypothesise that Clag3.1, Clag3.2 and Clag9 play a role in cytoadherence by interacting with this complex, in association with RhopH2 and RhopH3 at the Maurer's clefts surface. However, the cytoadherence complex is not likely to interact with the newly synthesised RhopH complex because the trafficking of PfEMP1 to the erythrocyte surface is largely completed by the mid-trophozoite stage of infection (45), while the RhopH complex is expressed in mature trophozoites. Alternatively, the cytoadherence complex could interact with the inherited RhopH complex, if it were transposed to the Maurer's clefts along the continuous membrane network originating from the parasitophorous vacuole (46), prior to the synthesis and assembly of the newly synthesised RhopH complex. The localisation of the inherited RhopH complex should be further investigated. Alternatively, the newly synthesised RhopH complex could participate in cytoadherence by interacting with the submembrane skeleton and/or the knobs, which might stabilise these structures and favour cytoadherence. The interaction between the RhopH and the cytoadherence complexes should be further investigated. However, it is also possible that export of rhoptry proteins to the Maurer's clefts represent a degradation pathway, as the Maurer's clefts could be functionally equivalent to exosomes. These vesicles, which fuse with lysosomes, contain proteins that are destined to be degraded (47); exosomes also eliminate 'obsolete' proteins in the extracellular medium by

fusing with the plasma membrane (48). It is thus possible that the RhopH complex proteins, when synthesised prior to the formation of rhoptries, are addressed to a degradation pathway because they are not necessary for the parasite development at that time of the erythrocytic cycle. The previous identification of a V-type H+ translocating pyrophosphatase within infected erythrocyte ghost preparations strengthens this hypothesis (35), suggesting that at least some Maurer's clefts could have an acidic pH, compatible with lysosomal activity.

In any case, the finding that rhoptry proteins are exported to the red blood cell cytoplasm suggests that they may play different roles according to their subcellular location and requires further investigation.

Acknowledgements

We thank M. Guillotte for her help in animal handling and A. Scherf and H. Vial for their support. L. Vincensini was supported by fellowships from the Ministère Français de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie, from the Fonds Inkerman de la Fondation de France, and from the Fondation des Treilles; S. Richert was supported by a fellowship from the Ministère Français de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie and the Internationales Graduiertenkolleg/International Research Training group 532. This work was supported by the Pasteur Institute, the Centre National de la Recherche Scientifique and the "Programme de Recherche Fondamentale en Microbiologie et Maladies Infectieuses et Parasitaires" from the Ministère Français de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie. The LSMBO thanks Bruker Daltonics for its financial and technical support.

References

1. Hay, S. I., Guerra, C. A., Tatem, A. J., Noor, A. M. & Snow, R. W. (2004) The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. *Lancet Infect Dis* **4,** 327-336.
2. Breton, C. B., Blisnick, T., Jouin, H., Barale, J. C., Rabilloud, T., Langsley, G. & Pereira da Silva, L. H. (1992) Plasmodium chabaudi p68 serine protease activity required for merozoite entry into mouse erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89,** 9647-9651.
3. Roggwiller, E., Betoulle, M. E., Blisnick, T. & Braun Breton, C. (1996) A role for erythrocyte band 3 degradation by the parasite gp76 serine protease in the formation of the parasitophorous vacuole during invasion of erythrocytes by Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol* **82,** 13-24.
4. Blackman, M. J., Fujioka, H., Stafford, W. H., Sajid, M., Clough, B., Fleck, S. L., Aikawa, M., Grainger, M. & Hackett, F. (1998) A subtilisin-like protein in secretory organelles of Plasmodium falciparum merozoites. *J Biol Chem* **273,** 23398-23409.
5. Hackett, F., Sajid, M., Withers-Martinez, C., Grainger, M. & Blackman, M. J. (1999) PfSUB-2: a second subtilisin-like protein in Plasmodium falciparum merozoites. *Mol Biochem Parasitol* **103,** 183-195.
6. Barale, J. C., Blisnick, T., Fujioka, H., Alzari, P. M., Aikawa, M., Braun-Breton, C. & Langsley, G. (1999) Plasmodium falciparum subtilisin-like protease 2, a merozoite candidate for the merozoite surface protein 1-42 maturase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96,** 6445-6450.
7. Greenbaum, D. C., Baruch, A., Grainger, M., Bozdech, Z., Medzihradszky, K. F., Engel, J., DeRisi, J., Holder, A. A. & Bogyo, M. (2002) A role for the protease falcipain 1 in host cell invasion by the human malaria parasite. *Science* **298,** 2002-2006.
8. Francis, S. E., Sullivan, D. J., Jr. & Goldberg, D. E. (1997) Hemoglobin metabolism in the malaria parasite Plasmodium falciparum. *Annu Rev Microbiol* **51,** 97-123.
9. Gamboa de Dominguez, N. D. & Rosenthal, P. J. (1996) Cysteine proteinase inhibitors block early steps in hemoglobin degradation by cultured malaria parasites. *Blood* **87,** 4448-4454.
10. Bray, P. G., Janneh, O., Raynes, K. J., Mungthin, M., Ginsburg, H. & Ward, S. A. (1999) Cellular uptake of chloroquine is dependent on binding to ferriprotoporphyrin IX and is independent of NHE activity in Plasmodium falciparum. *J Cell Biol* **145,** 363-376.
11. Banerjee, R., Liu, J., Beatty, W., Pelosof, L., Klemba, M. & Goldberg, D. E. (2002) Four plasmepsins are active in the Plasmodium falciparum food vacuole, including a protease with an active-site histidine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99,** 990-995.
12. Hadley, T., Aikawa, M. & Miller, L. H. (1983) Plasmodium knowlesi: studies on invasion of rhesus erythrocytes by merozoites in the presence of protease inhibitors. *Exp Parasitol* **55,** 306-311.
13. Lyon, J. A. & Haynes, J. D. (1986) Plasmodium falciparum antigens synthesized by schizonts and stabilized at the merozoite surface when schizonts mature in the presence of protease inhibitors. *J Immunol* **136,** 2245-2251.
14. Roggwiller, E., Fricaud, A. C., Blisnick, T. & Braun-Breton, C. (1997) Host urokinase-type plasminogen activator participates in the release of malaria merozoites from infected erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol* **86,** 49-59.

15. Salmon, B. L., Oksman, A. & Goldberg, D. E. (2001) Malaria parasite exit from the host erythrocyte: a two-step process requiring extraerythrocytic proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98,** 271-276.
16. Le Bonniec, S., Deregnaucourt, C., Redeker, V., Banerjee, R., Grellier, P., Goldberg, D. E. & Schrevel, J. (1999) Plasmepsin II, an acidic hemoglobinase from the Plasmodium falciparum food vacuole, is active at neutral pH on the host erythrocyte membrane skeleton. *J Biol Chem* **274,** 14218-14223.
17. Dua, M., Raphael, P., Sijwali, P. S., Rosenthal, P. J. & Hanspal, M. (2001) Recombinant falcipain-2 cleaves erythrocyte membrane ankyrin and protein 4.1. *Mol Biochem Parasitol* **116,** 95-99.
18. Hanspal, M., Dua, M., Takakuwa, Y., Chishti, A. H. & Mizuno, A. (2002) Plasmodium falciparum cysteine protease falcipain-2 cleaves erythrocyte membrane skeletal proteins at late stages of parasite development. *Blood* **100,** 1048-1054.
19. Miller, S. K., Good, R. T., Drew, D. R., Delorenzi, M., Sanders, P. R., Hodder, A. N., Speed, T. P., Cowman, A. F., de Koning-Ward, T. F. & Crabb, B. S. (2002) A subset of Plasmodium falciparum SERA genes are expressed and appear to play an important role in the erythrocytic cycle. *J Biol Chem* **277,** 47524-47532.
20. Wickham, M. E., Culvenor, J. G. & Cowman, A. F. (2003) Selective inhibition of a two-step egress of malaria parasites from the host erythrocyte. *J Biol Chem* **278,** 37658-37663. Epub 32003 Jul 37611.
21. Blisnick, T., Morales Betoulle, M. E., Barale, J. C., Uzureau, P., Berry, L., Desroses, S., Fujioka, H., Mattei, D. & Braun Breton, C. (2000) Pfsbp1, a Maurer's cleft Plasmodium falciparum protein, is associated with the erythrocyte skeleton. *Mol Biochem Parasitol* **111,** 107-121.
22. Hinterberg, K., Scherf, A., Gysin, J., Toyoshima, T., Aikawa, M., Mazie, J. C., da Silva, L. P. & Mattei, D. (1994) Plasmodium falciparum: the Pf332 antigen is secreted from the parasite by a brefeldin A-dependent pathway and is translocated to the erythrocyte membrane via the Maurer's clefts. *Exp Parasitol* **79,** 279-291.
23. Adisa, A., Albano, F. R., Reeder, J., Foley, M. & Tilley, L. (2001) Evidence for a role for a Plasmodium falciparum homologue of Sec31p in the export of proteins to the surface of malaria parasite-infected erythrocytes. *J Cell Sci* **114,** 3377-3386.
24. Hayashi, M., Taniguchi, S., Ishizuka, Y., Kim, H. S., Wataya, Y., Yamamoto, A. & Moriyama, Y. (2001) A homologue of N-ethylmaleimide-sensitive factor in the malaria parasite Plasmodium falciparum is exported and localized in vesicular structures in the cytoplasm of infected erythrocytes in the brefeldin A-sensitive pathway. *J Biol Chem* **276,** 15249-15255.
25. Wickham, M. E., Rug, M., Ralph, S. A., Klonis, N., McFadden, G. I., Tilley, L. & Cowman, A. F. (2001) Trafficking and assembly of the cytoadherence complex in Plasmodium falciparum-infected human erythrocytes. *Embo J* **20,** 5636-5649.
26. Haldar, K., Mohandas, N., Samuel, B. U., Harrison, T., Hiller, N. L., Akompong, T. & Cheresh, P. (2002) Protein and lipid trafficking induced in erythrocytes infected by malaria parasites. *Cell Microbiol* **4,** 383-395.
27. Kidd, D., Liu, Y. & Cravatt, B. F. (2001) Profiling serine hydrolase activities in complex proteomes. *Biochemistry* **40,** 4005-4015.
28. Cooper, J. A., Ingram, L. T., Bushell, G. R., Fardoulys, C. A., Stenzel, D., Schofield, L. & Saul, A. J. (1988) The 140/130/105 kilodalton protein complex in the rhoptries of Plasmodium falciparum consists of discrete polypeptides. *Mol Biochem Parasitol* **29,** 251-260.
29. Brown, H. J. & Coppel, R. L. (1991) Primary structure of a Plasmodium falciparum rhoptry antigen. *Mol Biochem Parasitol* **49,** 99-110.

30. Kaneko, O., Tsuboi, T., Ling, I. T., Howell, S., Shirano, M., Tachibana, M., Cao, Y. M., Holder, A. A. & Torii, M. (2001) The high molecular mass rhoptry protein, RhopH1, is encoded by members of the clag multigene family in Plasmodium falciparum and Plasmodium yoelii. *Mol Biochem Parasitol* **118,** 223-231.
31. Ling, I. T., Kaneko, O., Narum, D. L., Tsuboi, T., Howell, S., Taylor, H. M., Scott-Finnigan, T. J., Torii, M. & Holder, A. A. (2003) Characterisation of the rhoph2 gene of Plasmodium falciparum and Plasmodium yoelii. *Mol Biochem Parasitol* **127,** 47-57.
32. Sam-Yellowe, T. Y., Shio, H. & Perkins, M. E. (1988) Secretion of Plasmodium falciparum rhoptry protein into the plasma membrane of host erythrocytes. *J Cell Biol* **106,** 1507-1513.
33. Sam-Yellowe, T. Y. & Perkins, M. E. (1991) Interaction of the 140/130/110 kDa rhoptry protein complex of Plasmodium falciparum with the erythrocyte membrane and liposomes. *Exp Parasitol* **73,** 161-171.
34. Hiller, N. L., Akompong, T., Morrow, J. S., Holder, A. A. & Haldar, K. (2003) Identification of a stomatin orthologue in vacuoles induced in human erythrocytes by malaria parasites: A role for microbial raft-proteins in apicomplexan vacuole biogenesis. *J Biol Chem* **10,** 10.
35. Vincensini, L., Richert, S., Blisnick, T., Van Dorsselaer, A., Leize-Wagner, E., Rabilloud, T. & Braun Breton, C. (2005) Proteomic analysis identifies novel proteins of the maurer's clefts, a secretory compartment delivering plasmodium falciparum proteins to the surface of its host cell. *Mol Cell Proteomics* **24,** 24.
36. Lustigman, S., Anders, R. F., Brown, G. V. & Coppel, R. L. (1988) A component of an antigenic rhoptry complex of Plasmodium falciparum is modified after merozoite invasion. *Mol Biochem Parasitol* **30,** 217-224.
37. Bannister, L. H., Mitchell, G. H., Butcher, G. A. & Dennis, E. D. (1986) Lamellar membranes associated with rhoptries in erythrocytic merozoites of Plasmodium knowlesi: a clue to the mechanism of invasion. *Parasitology* **92,** 291-303.
38. Ling, I. T., Florens, L., Dluzewski, A. R., Kaneko, O., Grainger, M., Yim Lim, B. Y., Tsuboi, T., Hopkins, J. M., Johnson, J. R., Torii, M., Bannister, L. H., Yates, J. R., 3rd, Holder, A. A. & Mattei, D. (2004) The Plasmodium falciparum clag9 gene encodes a rhoptry protein that is transferred to the host erythrocyte upon invasion. *Mol Microbiol* **52,** 107-118.
39. Doury, J. C., Bonnefoy, S., Roger, N., Dubremetz, J. F. & Mercereau-Puijalon, O. (1994) Analysis of the high molecular weight rhoptry complex of Plasmodium falciparum using monoclonal antibodies. *Parasitology* **108,** 269-280.
40. Sam-Yellowe, T. Y., Fujioka, H., Aikawa, M., Hall, T. & Drazba, J. A. (2001) A Plasmodium falciparum protein located in Maurer's clefts underneath knobs and protein localization in association with Rhop-3 and SERA in the intracellular network of infected erythrocytes. *Parasitol Res* **87,** 173-185.
41. Marti, M., Good, R. T., Rug, M., Knuepfer, E. & Cowman, A. F. (2004) Targeting malaria virulence and remodeling proteins to the host erythrocyte. *Science* **306,** 1930-1933.
42. Howard, R. F. & Schmidt, C. M. (1995) The secretary pathway of plasmodium falciparum regulates transport of p82/RAP1 to the rhoptries. *Mol Biochem Parasitol* **74,** 43-54.
43. Baldi, D. L., Andrews, K. T., Waller, R. F., Roos, D. S., Howard, R. F., Crabb, B. S. & Cowman, A. F. (2000) RAP1 controls rhoptry targeting of RAP2 in the malaria parasite Plasmodium falciparum. *Embo J* **19,** 2435-2443.
44. Trenholme, K. R., Gardiner, D. L., Holt, D. C., Thomas, E. A., Cowman, A. F. & Kemp, D. J. (2000) clag9: A cytoadherence gene in Plasmodium falciparum essential

for binding of parasitized erythrocytes to CD36. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97,** 4029-4033.

45. Kriek, N., Tilley, L., Horrocks, P., Pinches, R., Elford, B. C., Ferguson, D. J., Lingelbach, K. & Newbold, C. I. (2003) Characterization of the pathway for transport of the cytoadherence-mediating protein, PfEMP1, to the host cell surface in malaria parasite-infected erythrocytes. *Mol Microbiol* **50,** 1215-1227.
46. Wickert, H., Wissing, F., Andrews, K. T., Stich, A., Krohne, G. & Lanzer, M. (2003) Evidence for trafficking of PfEMP1 to the surface of P. falciparum-infected erythrocytes via a complex membrane network. *Eur J Cell Biol* **82,** 271-284.
47. Fevrier, B. & Raposo, G. (2004) Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr Opin Cell Biol* **16,** 415-421.
48. Johnstone, R. M., Mathew, A., Mason, A. B. & Teng, K. (1991) Exosome formation during maturation of mammalian and avian reticulocytes: evidence that exosome release is a major route for externalization of obsolete membrane proteins. *J Cell Physiol* **147,** 27-36.

Figure legends

Figure 1: Detection of FP-biotin-reactive proteins from red blood cell ghost preparations. Soluble extracts from uninfected or infected ghost preparations (1 μg/μl) were incubated with FP-biotin (4 μM) for 1 h (50 mM Tris pH 8) either with (H) or without (NH) a preheating step (80°C, 5 min). Reaction was quenched with 2x Laemmli sample buffer (reducing), samples were run on SDS-PAGE, and FP-biotin labelling was visualised by blotting with peroxidase-conjugated avidin. Hydrolase activities specific to non heated infected red blood cell ghosts are arrowed. Molecular mass markers are indicated (kDa).

Figure 2: Affinity isolation and tandem mass spectrometry identification of FP-biotin labelled serine hydrolase activities. (A) An infected red blood cell ghost extract corresponding to 10^{10} parasites was labelled with FP-biotin (NH). Unbound molecules of FP-biotin were removed by exclusion chromatography prior to incubation with avidin agarose beads for 1 h at room temperature. Avidin-bound proteins were eluted by heating (5 min, 80°C) in one volume of 2x Laemmli sample buffer (reducing). 1/20 of total sample was run on SDS-PAGE and silver stained. A preheated sample (H) run on SDS-PAGE was used as a negative control. Bands 1 and 2 (arrowed) were specific to the non heated sample and were excised from the gel for tandem mass spectrometry processing. Molecular mass markers are indicated (kDa). (B) Sequence and molecular mass of the peptides identified by tandem mass spectrometry analysis of protein contained in band 2: 13 (out of 15) peptides identify RhopH2.

Figure 3: Sub-cellular allocation of RhopH2. Western blot analysis was performed using mouse serum raised against the amino-terminal domain of RhopH2 expressed as a recombinant GST-fusion protein. Lane 1, whole cell lysate of *P. falciparum* -infected

erythrocytes (iRBC); lane 2, infected erythrocyte ghosts; lanes 3, whole cell lysate of uninfected erythrocytes (RBC). The samples correspond to 10^7 (total iRBC), 3 X 10^7 (iRBC ghosts) and 10^7 (RBC) erythrocytes respectively. The specifically detected 140 kDa polypeptide is arrowed. Molecular mass markers are indicated (kDa).

Figure 4: Indirect immunofluorescence of* P. falciparum *infected erythrocytes. Acetone/methanol fixed infected erythrocytes at different stages of the parasite intra-erythrocytic cycle were incubated with the RhopH2 specific antibodies. The nuclei were stained with Dapi (blue). Negative control was performed using pre-immune serum and anti-GST antibodies (not shown).

Figure 5: Detection of RhopH2 throughout the erythrocyte cycle. Western blot analysis was performed with the RhopH2 specific serum using total infected erythrocyte extracts prepared from different time points of a synchronous *P. falciparum* culture (13 to 48 h post invasion, as indicated). Each sample corresponds to $3X10^8$ cells. Molecular mass markers are indicated (kDa).

Figure 6: Topology and localisation of RhopH2. Ghosts were prepared from *P. falciparum*-infected (IRBC) erythrocytes, and incubated in hypotonic buffer (lane 1) supplemented with 0.5 % Triton X100 (TX100) (lane 2), 5 mg ml^{-1} proteinase K (PK) (lane 3) or 0.5 % Triton X100 and 5 mg ml^{-1} proteinase K (lane 4) as indicated. The digest products were analysed by Western blotting using the RhopH2 specific serum. The 140 kDa RhopH2 band and the **xx** kDa degradation product are arrowed. Molecular mass markers are indicated (kDa).

Figure 7: Immunoprecipitation of RhopH2 from infected erythrocyte and infected erythrocyte ghost extracts. Immunoprecipitations were performed on infected erythrocyte (lanes 1) or infected erythrocyte ghost extracts (lanes 2), using an unrelated serum (raised against GST) as a negative control, and the RhopH2 specific serum. The samples loaded on

the gel correspond respectively to 1.5 10^7 (total extract) and 4 10^7 (ghost extract) infected erythrocytes. Bands corresponding to the RhopH 1-2-3 proteins are arrowed and annotated as (1) (2) (3) respectively. Molecular mass markers are indicated (kDa).

Figure 1

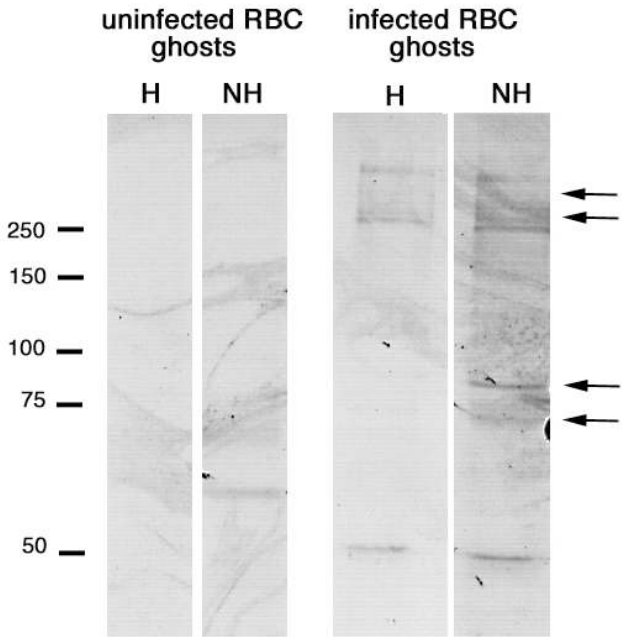
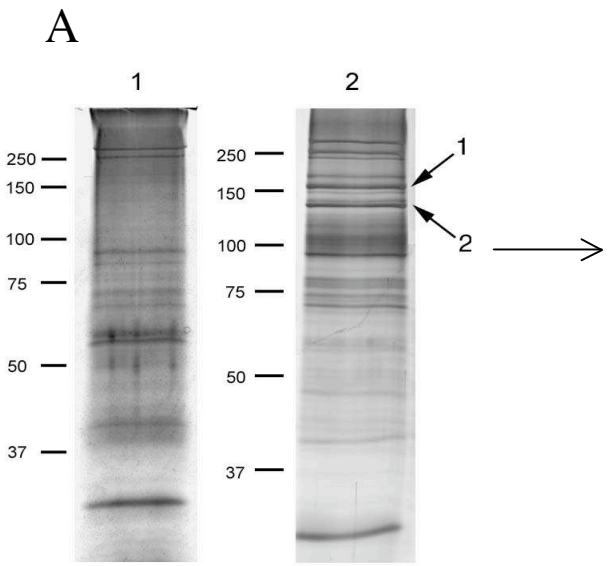


Figure 2



B

Mass	Sequence	BLAST
801,2	LA(FG)HEK	NI
917,4	TTEYYLK	RhopH2
953,4	QYVTTLTK	RhopH2
973,4	LSLAPD(MA)R	RhopH2
986,4	GENPAELEK	NI
1040,38	LPLEDYYK	RhopH2
1075,4	YNFLDLYK	RhopH2
1146,4	QLDDEELER	RhopH2
1149,2	VSNLTND(EM)K	RhopH2
1158,4	WSDLTY M/F VK	RhopH2
1194,4	(YL)LDNSNPMK	RhopH2
1220,4	VFNGLPA M/F LDK	RhopH2
1431,4	_FDEY M/F M/F ASNK	RhopH2
1435,5	(VQ)LPE(GC)FG	NI

Figure 3

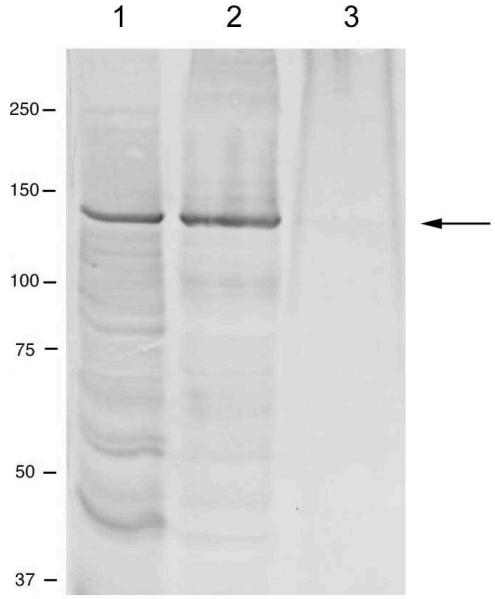


Figure 4

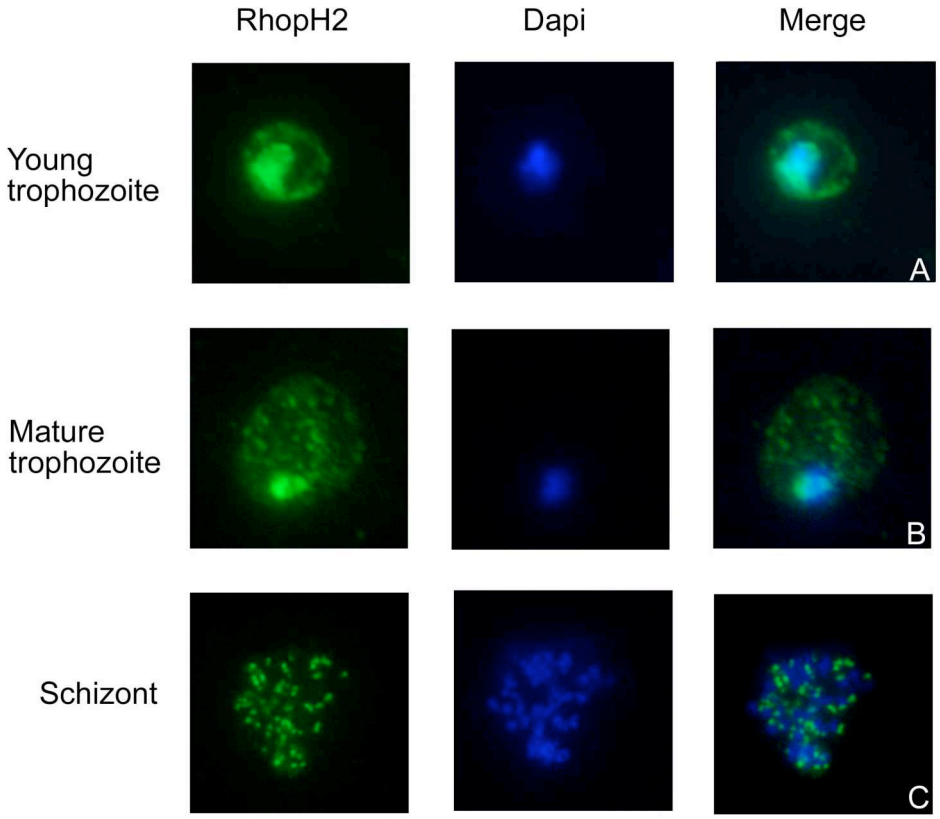


Figure 5

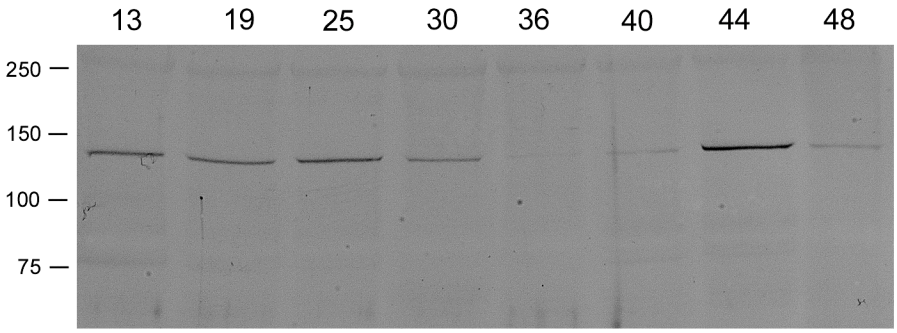


Figure 6

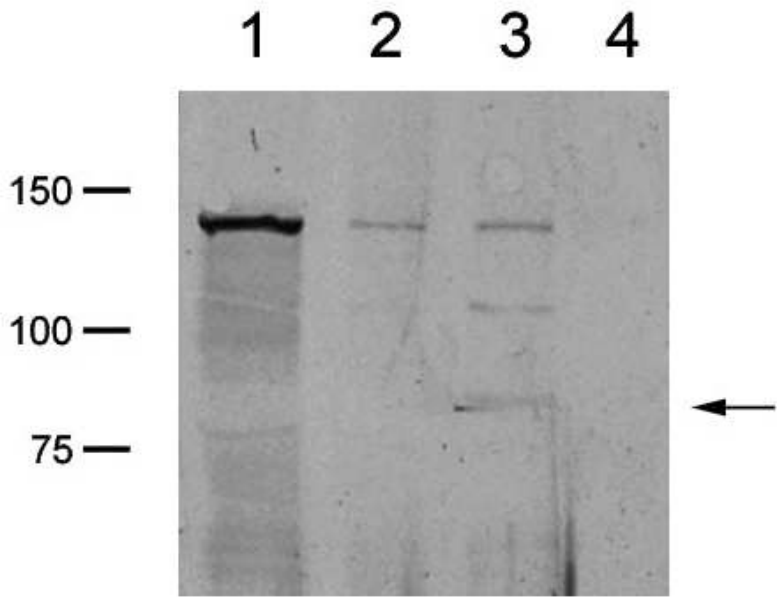
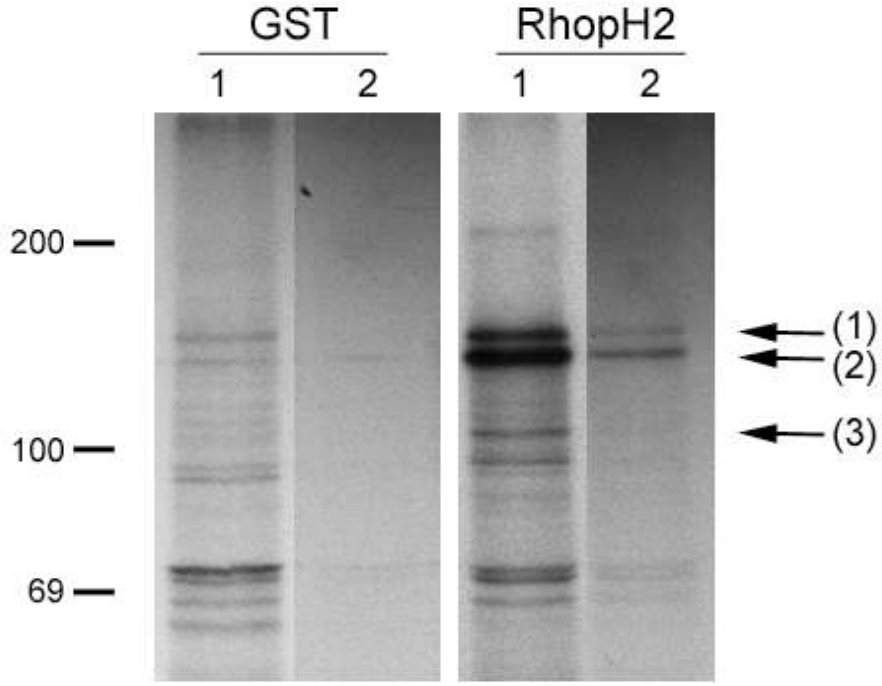


Figure 7



Discussion

L'objectif de ce travail est de mieux caractériser les agents moléculaires participant à l'étape de libération des mérozoïtes hors du globule rouge parasité. Ce processus est en effet essentiel au développement du parasite et à la poursuite de l'infection, et nous pensons que cette étude pourrait conduire à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. A ce jour, plusieurs enzymes participant à la libération des mérozoïtes sont connues ; il s'agit notamment de protéases à cystéine et aspartate (Le Bonniec, Deregnaucourt *et al.* 1999; Dua, Raphael *et al.* 2001; Hanspal, Dua *et al.* 2002). Mais alors que ce processus est sensible aux inhibiteurs de sérylprotéases, aucune enzyme de cette famille n'a encore été identifiée. Nous avons donc cherché à identifier les sérylprotéases de *P. falciparum* impliquées dans la libération des mérozoïtes. Pour cela, nous avons utilisé la FP-biotine, une molécule formée d'un fluorophosphonate couplé à la biotine, développée dans le laboratoire de Benjamin Cravatt, au Scripps Research Institute (Etats-Unis) (Liu, Patricelli *et al.* 1999). L'avantage du fluorophosphonate, inhibiteur spécifique des hydrolases à sérine, est de se lier uniquement aux sites catalytiques fonctionnels. Le couplage avec une molécule de biotine permet ensuite de purifier les protéines marquées. Ainsi, la FP-biotine est une sonde moléculaire qui permet de purifier spécifiquement les hydrolases à sérine actives (à l'exclusion notamment des pro-enzymes) à partir d'échantillons protéiques complexes (Kidd, Liu *et al.* 2001). Les enzymes que nous cherchons à caractériser sont impliquées dans la libération des mérozoïtes, et notamment dans la rupture de la membrane érythrocytaire. Ces enzymes sont donc très probablement exportées dans le cytoplasme du globule rouge ; elles sont susceptibles d'être accumulées sous la forme de pro-enzymes dans les structures de Maurer, où elles pourront être activées avant d'être amenées au niveau de la membrane érythrocytaire, lors de la libération des mérozoïtes. Nous avons donc décidé de travailler avec des préparations de fantômes d'érythrocytes parasités par *P. falciparum*, qui contiennent la membrane érythrocytaire, les protéines du squelette sous-membranaire, ainsi que les structures de Maurer (Blisnick, Morales Betoulle *et al.* 2000). Ceci présente le double avantage de limiter la complexité de l'échantillon et de permettre de cibler les enzymes dont l'activité est localisée à proximité de la membrane érythrocytaire.

Nous avons effectivement détecté au sein des préparations de fantômes de globules rouges parasités un certain nombre de protéines interagissant avec la FP-biotine. Le contrôle négatif

de cette expérience permet d'attester de la spécificité de cette interaction : il consiste à incuber en présence de FP-biotine le même échantillon préalablement chauffé 5 min à 80°C. Le chauffage ayant pour effet de détruire le site actif des hydrolases à sérine, les interactions mises en évidence correspondent alors à un marquage non spécifique (Kidd, Liu *et al.* 2001). Nous avons ensuite tenté de purifier ces protéines, en incubant le mélange de protéines marquées par la FP-biotine avec des billes d'avidine agarose. L'analyse d'une fraction de l'éluat sur un gel SDS-PAGE coloré au nitrate d'argent montre qu'un certain nombre de protéines sont effectivement enrichies lors de la purification. Il est intéressant de constater que les protéines les plus fortement marquées par la FP-biotine ne sont pas toujours les mieux enrichies : c'est notamment le cas des protéines dont la masse moléculaire est comprise entre 80 et 100 kDa. La totalité des protéines purifiées a ensuite été déposée sur un gel SDS-PAGE préparatif, qui a été coloré au bleu de Coomassie colloïdal. Cette méthode de coloration, qui est moins sensible que le nitrate d'argent mais davantage compatible avec les analyses de spectrométrie de masse, n'a permis de visualiser que deux bandes protéiques spécifiques, correspondant à des protéines de 160 et 140 kDa respectivement. Elles ont été découpées et analysées par spectrométrie de masse en tandem, au Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique, à Strasbourg. L'analyse de la première bande a détecté des peptides dont la séquence ne correspond à aucune protéine connue, mais en revanche l'analyse de la seconde a identifié 14 peptides, dont 11 alignent avec la protéine RhopH2. Le pourcentage de recouvrement, qui est de 7 %, est significatif en raison de la taille de la protéine identifiée : 1364 acides aminés, pour une masse moléculaire de 140 kDa environ. Par ailleurs, le nombre élevé de peptides identifiés renforce la validité de ce résultat.

La protéine RhopH2 a été initialement décrite comme étant localisée dans les rhoptries. Les rhoptries font partie des organites localisés dans le complexe apical du mérozoïte, qui participent au processus d'invasion. Les rhoptries, au nombre de deux chez *Plasmodium*, sont des organites en forme de poire qui occupent jusqu'à un tiers du volume du mérozoïte (Atkinson, Aikawa *et al.* 1987). Elles ont des caractéristiques de compartiment sécrétoire (Ngo, Yang *et al.* 2004), et libèrent des protéines et des lamelles membranaires qui participent à la formation de la membrane de la vacuole parasitophore (Bannister, Mitchell *et al.* 1986; Bannister and Mitchell 1989; Hiller, Akompong *et al.* 2003). Les rhoptries libèrent notamment des enzymes qui dégradent des protéines de la membrane érythrocytaire et des protéines qui servent de ligand à la membrane érythrocytaire (Sam-Yellowe, Shio *et al.* 1988; Braun-Breton, Blisnick *et al.* 1992; Ogun and Holder 1996; Roggwiller, Betoulle *et al.* 1996).

La protéine RhopH2 fait partie du complexe RhopH (*high molecular mass protein complex*), qui est formé de l'assemblage de trois protéines, RhopH1 (150 kDa), RhopH2 (140 kDa) et RhopH3 (110 kDa) (Cooper, Ingram *et al.* 1988). Ce complexe est dissocié lors d'un traitement avec 1 % de SDS, ce qui indique que les protéines RhopH sont associées de façon non covalente (Lustigman, Anders *et al.* 1988). Si les protéines RhopH2 et RhopH3 sont spécifiées par des gènes uniques qui ont été identifiés (Brown and Coppel 1991; Kaneko, Tsuboi *et al.* 2001; Ling, Kaneko *et al.* 2003), en revanche il semble que plusieurs gènes puissent spécifier la protéine RhopH1 (Kaneko, Tsuboi *et al.* 2001; Ling, Florens *et al.* 2004). Ce résultat pourrait expliquer la diversité de taille des protéines immunoprécipitées par un anticorps dirigé contre RhopH1 au sein d'une culture parasitaire donnée (Ling, Florens *et al.* 2004) et être à l'origine du polymorphisme de taille de cette protéine qui a été décrit entre différents isolats de *P. falciparum* (Doury, Bonnefoy *et al.* 1994). De façon tout à fait intéressante, les trois gènes spécifiant RhopH1 qui ont été décrits appartiennent à la famille multigénique *clag* (*cytoadhesion linked antigen*) (Kaneko, Tsuboi *et al.* 2001; Ling, Florens *et al.* 2004), dont des travaux ont montré qu'au moins un membre participe au phénomène de cytoadhérence (Trenholme, Gardiner *et al.* 2000). Ce résultat suggère donc que les protéines CLAG sont susceptibles d'exercer des fonctions différentes selon leur localisation subcellulaire. Lors de l'invasion, le complexe RhopH est intégralement transféré au niveau des membranes de l'érythrocyte et de la vacuole parasitophore du globule rouge nouvellement parasité (Lustigman, Anders *et al.* 1988; Hiller, Akompong *et al.* 2003). Sa fonction exacte n'est pas connue, mais il est probable que le complexe participe à la formation de la membrane de la vacuole parasitophore et à l'établissement de l'infection par *P. falciparum*. En particulier, une étude récente a montré que, lors de l'invasion, la protéine RhopH2 est insérée dans la membrane de la vacuole parasitophore, où elle est associée à des domaines enrichis en sphingolipides et en cholestérol, appelés *rafts* (Hiller, Akompong *et al.* 2003).

L'identification d'une protéine du complexe RhopH au sein des préparations de fantômes de globules rouges parasités est donc inattendue, et demande tout d'abord à être validée. Pour ce faire, nous avons obtenu un sérum polyclonal spécifique en injectant à des souris le domaine amino-terminal de la protéine RhopH2 exprimé sous la forme d'une protéine recombinante fusionnée à la GST. Nous avons dans un premier temps validé le sérum obtenu, par des expériences d'immunoempreinte, d'immunoprécipitation et d'immunofluorescence. Le sérum ne réagit avec des globules rouges sains ni en immunoempreinte ni en immunofluorescence. En immunoempreinte, le sérum reconnaît spécifiquement une protéine de 140 kDa, associée à

des extraits parasitaires totaux. Nous avons réalisé des expériences d'immunoprécipitation, à partir d'une culture synchrone de *P. falciparum* métaboliquement marquée avec de la méthionine radioactive, entre les stades trophozoïte très jeune (6 heures après l'invasion) et trophozoïte mûr. Les anticorps spécifiques de RhopH2 immunoprécipitent non seulement une protéine radioactive de 140 kDa, mais aussi deux autres protéines de 150 et 110 kDa, qui sont probablement RhopH1 et RhopH3, dans la mesure où les protéines du complexe RhopH coimmunoprécipitent (Lustigman, Anders *et al.* 1988). En immunofluorescence, le marquage observé sur des schizontes mûrs est caractéristique de celui d'une protéine des rhoptries : il est constitué de deux points localisés à l'apex de chaque noyau. Ainsi, la spécificité du sérum dirigé contre RhopH2 que nous avons obtenu est désormais établie, aussi bien en immunoempreinte qu'en immunoprécipitation et immunofluorescence. Nous avons alors utilisé ces anticorps pour étudier l'association de la protéine RhopH2 avec les préparations de fantômes érythrocytaires et les structures de Maurer. En immunoempreinte, les anticorps interagissent spécifiquement avec une protéine de 140 kDa présente dans les préparations de fantômes de globules rouges parasités : la protéine RhopH2 semble effectivement être associée aux fantômes de globules rouges parasités. La nature de cette association a pu être précisée par des expériences de digestion de préparations de fantômes érythrocytaires par la protéinase K en présence et en absence de détergent. Des analyses d'immunoempreinte montrent que RhopH2 est partiellement protégée de la protéolyse en l'absence de détergent, ce qui montre que le domaine amino-terminal de cette protéine, contre lequel est dirigé l'anticorps utilisé, est localisé dans la lumière de vésicules fermées. Les logiciels de prédiction des domaines transmembranaires indiquent que RhopH2 possède un domaine transmembranaire localisé entre les résidus 736 et 769. Un fragment de dégradation d'environ 80 kDa est détecté, ce qui est compatible avec le modèle selon lequel le domaine amino-terminal, compris entre les résidus 1 et 769, est localisé au sein d'une vésicule fermée. Dans la mesure où les structures de Maurer sont les seules structures vésiculaires décrites en association avec les préparations de fantômes de globules rouges parasités, ce résultat montre que la protéine RhopH2 est au moins partiellement exportée vers les structures de Maurer. Il est important de noter que cette expérience a été réalisée à partir d'une culture de parasites synchrones, récoltés au stade trophozoïte mûr, ne possédant donc pas encore de rhoptries. Nous avons également analysé la localisation subcellulaire de RhopH2 au stade trophozoïte mûr par immunofluorescence. Le marquage observé est double : à la fois diffus autour du noyau, indiquant que la protéine RhopH2 est essentiellement localisée dans le cytoplasme du

parasite (même si une fraction pourrait être localisée dans la vacuole parasitophore), et ponctiforme dans le cytoplasme du globule rouge, ce qui confirme les résultats de l'expérience de digestion par la protéinase K selon lesquels la protéine RhopH2 est au moins partiellement exportée dans les structures de Maurer, au stade trophozoïte mûr. Bien entendu, des études de microscopie électronique et de colocalisation de RhopH2 avec une protéine de la vacuole parasitophore permettraient de préciser sa localisation subcellulaire. Malheureusement, aucun marquage n'a été détecté avec les anticorps spécifiques de RhopH2 sur des préparations de fantômes érythrocytaires. Nous pensons qu'une partie de la protéine pourrait être perdue lors de la lyse cellulaire et de la préparation des fantômes, rendant la protéine indétectable en immunofluorescence. Elle serait détectée en immunoempreinte parce que les anticorps sont plus sensibles par cette méthode, comme l'indique la dilution à laquelle nous les utilisons : 1/400e à 1/800e, contre 1/200e en immunofluorescence. Néanmoins, nos résultats montrent que la protéine RhopH2 est présente avant la formation des rhoptries, au stade trophozoïte mûr, et qu'elle est alors partiellement exportée dans les structures de Maurer. Dans la mesure où les protéines du complexe RhopH sont immédiatement assemblées après leur synthèse (Lustigman, Anders *et al.* 1988), ce résultat est en accord avec une étude plus ancienne, montrant que la protéine RhopH3 est également synthétisée dès le stade trophozoïte mûr, et qu'elle est alors exportée dans le cytoplasme du globule rouge, où elle est associée avec des structures membranaires qui pourraient être les structures de Maurer (Sam-Yellowe, Shio *et al.* 1988; Sam-Yellowe, Fujioka *et al.* 2001). Par ailleurs, il serait intéressant de réaliser une expérience de digestion par la protéinase K au stade schizonte, afin d'établir si la protéine RhopH2 persiste dans les structures de Maurer jusqu'à la libération des mérozoïtes.

La présence d'une protéine de rhoptries dans le cytoplasme du globule rouge parasité soulève la question de son origine. En effet, la protéine RhopH2 que nous avons détectée pourrait provenir du complexe RhopH transféré par le mérozoïte dans la vacuole parasitophore lors de l'invasion (Lustigman, Anders *et al.* 1988; Hiller, Akompong *et al.* 2003) ; alternativement, il pourrait s'agir d'une protéine endogène néosynthétisée. La synthèse des protéines du complexe RhopH débute 32 à 36 heures après l'invasion (Cooper, Ingram *et al.* 1988), et la durée de vie du complexe RhopH hérité est mal connue : des expériences de pulse et chasse ont montré que le complexe est toujours présent au stade trophozoïte jeune, 18 heures après l'invasion (Lustigman, Anders *et al.* 1988), mais nos résultats suggèrent qu'il pourrait persister plus longtemps. En effet, nous montrons par immunoempreinte que la protéine RhopH2 est présente tout au long du cycle érythrocytaire. Afin de répondre à cette question, nous avons

réalisé un marquage métabolique d'une culture synchrone de *P. falciparum* au stade trophozoïte très jeune (6 heures après l'invasion), pendant 18 heures. Les trophozoïtes mûrs ont été récoltés, et nous avons préparé des fantômes d'érythrocytes. Le résultat des expériences d'immunoprécipitation ne varie pas selon que l'on utilise un extrait total ou un extrait de fantômes érythrocytaires : les anticorps spécifiques de RhopH2 immunoprécipitent une protéine radioactive de 140 kDa. Ainsi, la protéine RhopH2 qui est exportée dans les structures de Maurer au stade trophozoïte mûr est néosynthétisée. Les anticorps immunoprécipitent également deux autres protéines de 150 et 110 kDa au sein des préparations de fantômes, ce qui indique que c'est le complexe RhopH néosynthétisé complet qui semble être exporté dans les structures de Maurer. Ce résultat est également corroboré par des analyses d'immunofluorescence réalisées avec le sérum dirigé contre la protéine RhopH2. En effet, le marquage observé à différents stades du développement érythrocytaire suggère que la protéine RhopH2 est tout d'abord localisée dans la vacuole parasitophore (stade trophozoïte très jeune), puis dans le cytoplasme du parasite et les structures de Maurer (stade trophozoïte mûr), et enfin, au stade schizonte mûr, RhopH2 est localisée dans les rhoptries. Toutefois, le résultat de l'expérience d'immunoprécipitation, et en particulier l'intensité relative des marquages radioactifs détectés en association avec les extraits totaux et de fantômes indique que seule une faible fraction du complexe RhopH est exportée vers les structures de Maurer. Par ailleurs, ce résultat n'exclut pas qu'il persiste dans le cytoplasme du globule rouge, et plus précisément les structures de Maurer, des molécules de complexe RhopH héritées du cycle précédent. Il serait donc très intéressant de réaliser une expérience de marquage métabolique de parasites au stade schizonte, et de les laisser envahir des globules rouges sains dans un milieu non radioactif : cela permettrait de suivre l'évolution du complexe RhopH hérité tout au long du cycle érythrocytaire suivant, et de déterminer sa localisation et sa durée de vie exactes. Une expérience de digestion par la protéinase K réalisée au stade trophozoïte très jeune permettrait également de préciser si le complexe hérité est associé aux structures de Maurer, même si aucun marquage n'est observé en immunofluorescence.

Par ailleurs, le fait que des protéines de rhoptries soient détectées dans le cytoplasme de globules rouges parasités soulève la question de la fonction qu'elles pourraient y exercer. En effet, l'adressage des protéines aux rhoptries dépend de l'appareil de sécrétion classique (Howard and Schmidt 1995; Baldi, Andrews *et al.* 2000), et il semble peu probable que des protéines destinées aux rhoptries soient dans un premier temps exportées hors du parasite. Les structures de Maurer pourraient constituer l'équivalent fonctionnel des exosomes, ces

vésicules vers lesquelles sont transportées les protéines destinées à être dégradées, et qui fusionnent ensuite avec les lysosomes (pour revue (Fevrier and Raposo 2004)). Il est également intéressant de constater que certains exosomes éliminent des protéines 'obsolètes' en fusionnant avec la membrane plasmique : les protéines sont alors éliminées dans le milieu extracellulaire (Johnstone, Mathew *et al.* 1991). Il est possible que les protéines du complexe RhopH synthétisées avant la formation des rhoptries soient inutiles pour la cellule, et donc adressées vers une voie de dégradation ou d'élimination. L'identification par spectrométrie de masse d'une pompe transporteur de H+ associée aux préparations de fantômes érythrocytaires (voir chapitre 3) renforce cette hypothèse, en suggérant qu'au moins certaines structures de Maurer ont un pH acide, compatible avec une activité protéolytique de type lysosomal. Alternativement, l'export de protéines du complexe RhopH dans le cytoplasme du globule rouge pourrait être le signe que ces protéines participent à plusieurs processus cellulaires, et en particulier exercent des fonctions différentes selon qu'elles sont localisées dans les rhoptries et libérées au cours de l'invasion, ou dans les structures de Maurer à une étape plus précoce du développement érythrocytaire. La fonction exercée par le complexe RhopH pourrait d'ailleurs varier selon la protéine RhopH1 qui le constitue, dans la mesure où au moins deux gènes *clag* peuvent spécifier cette protéine. Il est également possible que les protéines du complexe RhopH soient exportées dans le cytoplasme de façon non spécifique : RhopH2 pourrait établir des interactions protéiques avec des protéines escortes qui sont exportées, ou bien le motif KYLLD de la protéine pourrait être reconnu comme étant un motif d'export (Pexel) atypique (Marti, Good *et al.* 2004).

La ou les fonctions du complexe RhopH ne sont pas connues avec précision. Si le complexe RhopH participe au processus d'invasion, comme l'illustre le fait que des anticorps monoclonaux spécifiques inhibent partiellement l'invasion *in vitro* (Doury, Bonnefoy *et al.* 1994), il ne semble pas intervenir directement dans l'interaction entre le mérozoïte et la membrane érythrocytaire. En effet, le complexe RhopH n'interagit avec des globules rouges sains que s'ils ont été prétraités avec des peptides mimant la protéine MSP-1 (Sam-Yellowe and Perkins 1991). Des études récentes, montrant que la protéine RhopH2 est insérée dans la membrane de la vacuole parasitophore néoformée, suggèrent fortement que le contenu lipidique et protéique des rhoptries sert à la formation de cette membrane (Hiller, Akompong *et al.* 2003). Il a par ailleurs été proposé que le complexe RhopH intégré à la membrane de la vacuole parasitophore constitue un premier élément de la machinerie de transport mise en place dans le cytoplasme du globule rouge, qui permettrait ensuite l'export des protéines

synthétisées et, plus généralement l'établissement des modifications ultrastructurales de la cellule hôte observées lors de l'infection par *P. falciparum* (Ling, Florens *et al.* 2004). Cette hypothèse pourrait également s'appliquer au complexe RhopH exporté dans les structures de Maurer, qui participerait alors au transport des protéines : cette fonction serait tout d'abord assurée par le complexe hérité, si sa localisation au sein des structures de Maurer était avérée, puis par la forme néosynthétisée exportée. En particulier, le complexe RhopH exporté dans les structures de Maurer pourrait participer au transport de PfEMP1, comme cela a déjà été suggéré (Craig 2000). Ceci permettrait peut-être d'expliquer pourquoi les gènes *clag*, dont certains spécifient la protéine RhopH1 (Kaneko, Tsuboi *et al.* 2001; Ling, Florens *et al.* 2004), ont été initialement décrits comme des acteurs du phénomène de cytoadhérence (Trenholme, Gardiner *et al.* 2000). Afin de préciser ce mécanisme, il serait très utile de savoir si le complexe hérité est associé aux fantômes érythrocytaires : en effet, le transport de la protéine PfEMP1 s'achève au stade trophozoïte, vers 20 heures après l'invasion, alors que la synthèse et l'export du complexe RhopH endogène débutent 36 heures après l'invasion (Lustigman, Anders *et al.* 1988). Il est également possible que le complexe RhopH soit ultérieurement sécrété hors des structures de Maurer, dans le milieu extracellulaire, où il pourrait par exemple participer à une maturation protéolytique de protéines de surface de l'érythrocyte, dont PfEMP1. La sécrétion du complexe RhopH n'a pas été décrite, mais un tel événement, qui aboutirait à une forte dilution du complexe, serait difficile à mettre en évidence. L'hypothèse du complexe RhopH exerçant une maturation protéolytique d'une protéine est en effet très tentante, compte tenu de la façon dont nous avons identifié la protéine RhopH2 d'une part, mais aussi parce que nous avons identifié de la même façon la protéine RhopH1, en faisant une purification de protéines marquées avec la FP-biotine à partir d'une préparation de mérozoïtes.

Néanmoins, l'étude de l'activité sérylhydrolase de RhopH2 reste incomplète. Les logiciels de prédiction de fonction biologique n'indiquent pas les caractéristiques classiques d'une protéase à sérine. Nous avons réalisé des expériences d'immunoprécipitation d'extraits de globules rouges parasités avec le sérum spécifique de RhopH2, et nous avons cherché à mettre en évidence une activité potéolytique associée à l'immunoprécipitat. Malheureusement, les protéases du sérum utilisé interagissent aussi avec la colonne d'affinité et faussent les résultats. De plus, une grande limitation de cette méthode réside dans le fait que l'activité enzymatique est révélée par la digestion d'un substrat artificiel (couplé à un groupement fluorogénique) : seul un certain nombre de substrats peuvent être utilisés, et le fait de ne pas

détecter une activité enzymatique peut signifier que le substrat choisi est inadéquat. Par ailleurs, même si l'interaction est faible, il est vrai qu'une protéine de 140 kDa interagit de façon spécifique avec la FP-biotine, mais des expériences d'immunoprécipitation réalisées avec les anticorps dirigés contre RhopH2 à partir d'un extrait de fantômes érythrocytaires préalablement incubé avec la FP-biotine n'ont pas permis d'immunoprécipiter une protéine marquée par la FP-biotine. Nous pensons que le marquage par la FP-biotine peut entraver l'interaction anticorps-antigène. C'est pourquoi nous allons utiliser l'approche inverse, incubant le surnageant d'une immunoprécipitation par le sérum dirigé contre RhopH2 avec la FP-biotine : nous espérons montrer ainsi que l'immunoprécipitation par le sérum dirigé contre RhopH2 a eu pour effet de dépléter l'échantillon de la protéine de 140 kDa qui interagit avec la FP-biotine. Par ailleurs, nous allons augmenter la sensibilité du système de détection en utilisant une révélation basée sur le phénomène de chimioluminescence. Ce système de détection permettra peut-être aussi de préciser si d'autres protéines du complexe RhopH, et en particulier RhopH1, interagissent avec la FP-biotine et ont une activité sérylhydrolase : les expériences ont été réalisées dans des conditions qui préservent l'assemblage du complexe RhopH.

Quoi qu'il en soit, la détection de protéines de rhoptries dans les structures de Maurer soulève de nombreuses questions quant à la possibilité que certaines protéines puissent participer à des processus cellulaires très variés selon leur localisation subcellulaire, et leur étude s'annonce d'ores et déjà très stimulante.

Chapitre 3 : Analyse protéomique globale des fantômes de globules rouges parasités et des structures de Maurer

Introduction

Deux articles, publiés en 2002 dans le même numéro de *Nature*, ont marqué le début de l'ère de la protéomique globale chez *P. falciparum* (Florens, Washburn *et al.* 2002; Lasonder, Ishihama *et al.* 2002). Dans chacune des études, les auteurs ont identifié de la façon la plus exhaustive possible l'ensemble des protéines présentes à différents stades du développement de *P. falciparum*, en utilisant la technique de MudPIT, ou multidimensional protein identification technology. Il s'agit en fait d'une chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem (nanoLC-MS/MS) (Washburn, Wolters *et al.* 2001). Florens et collègues ont étudié quatre stades du développement de *P. falciparum* : sporozoïte, mérozoïte, trophozoïte, et gamétocyte. L'intérêt majeur de leurs travaux est de ne pas se limiter aux stades sanguins de *P. falciparum* : ils exploitent la possibilité d'infecter des moustiques *in vitro* pour récolter les parasites au stade sporozoïte. La seconde étude se concentre sur les stades érythrocytaires de *P. falciparum* : trophozoïte, schizonte, gamétocyte et gamète (Lasonder, Ishihama *et al.* 2002). Les protéines sont identifiées selon la même technique, à ceci près qu'une étape préalable d'extraction par congélation/décongélation sépare les protéines en deux fractions, soluble et insoluble ; la fraction soluble est analysée directement par MudPIT, alors que les protéines insolubles sont d'abord séparées en gel d'acrylamide. Chacune des études identifie un très grand nombre de protéines (2415 pour la première, 1289 pour la seconde), dont beaucoup dérivent de gènes spécifiant des protéines hypothétiques (1360 et 595 respectivement). Ces protéines dites hypothétiques qui n'ont pas

d'homologie avec des protéines connues sont susceptibles de participer à des processus cellulaires spécifiques au parasite, et sont à ce titre particulièrement intéressantes. Ces deux études ont permis de générer une banque de données du protéome de *P. falciparum* à différents stades de son développement, qui peut être exploitée de multiples façons, et en particulier servir de point de comparaison aux autres analyses protéomiques. Néanmoins, par rapport à la question qui nous intéressait, à savoir l'identification de protéines au sein des fantômes de globules rouges parasités et des structures de Maurer, ces études présentent l'inconvénient d'avoir été réalisées sur des cellules entières, et donc à partir d'échantillons protéiques complexes. D'autre part, lorsque nous avons initié ce travail, la spectrométrie de masse était limitée par le fait que le séquençage du génome n'était pas encore achevé (Gardner, Hall *et al.* 2002), et la spectrométrie de masse en tandem n'était pas un outil facilement accessible. Pour l'ensemble de ces raisons, nous nous sommes orientés dans un premier temps vers une étude protéomique beaucoup plus ciblée des préparations de fantômes de globules rouges parasités, en collaboration avec Thierry Rabilloud (CEA Grenoble). La stratégie adoptée consistait à analyser les préparations de fantômes de globules rouges parasités par électrophorèse bidimensionnelle ; afin de distinguer les protéines parasitaires des protéines érythrocytaires, des préparations de fantômes de globules rouges sains étaient traitées en parallèle. L'analyse comparative de ces gels devait nous permettre de sélectionner les *spots* correspondant spécifiquement aux protéines parasitaires, et d'identifier de la sorte les protéines parasitaires associées aux préparations de fantômes de globules rouges parasités. De plus, les préparations de fantômes étaient préalablement extraites de façon à enrichir l'échantillon en protéines solubles, et donc susceptibles d'être localisées dans les structures de Maurer. Mais cette approche n'a pas donné les résultats escomptés : si nous avons pu détecter sur les gels analytiques une dizaine de *spots* protéiques spécifiques aux fantômes de globules rouges parasités, en revanche la quantité de matériel que nous pouvions déposer sur les gels préparatifs s'est révélée trop faible pour identifier la plupart d'entre eux. Parmi les quatre *spots* découpés, trois contenaient la protéine Pf72-HSP70, une protéine de choc thermique, et le dernier la Protéine Disulfide Isomérase parasitaire (PfPDI). Ces résultats sont intéressants en eux-mêmes, et nous les mettrons en relation avec les résultats présentés dans ce chapitre, mais ils n'ouvrent pas de grandes perspectives pour l'étude du rôle biologique des structures de Maurer ! Néanmoins, c'est au cours de cette étape intermédiaire, et lors de l'étude des hydrolases à sérine présentée au chapitre 2, que nous avons établi une solide collaboration avec Emmanuelle Leize-Wagner et Sophie Richert, au Laboratoire de Spectrométrie de Masse

Bio-Organique (Université de Strasbourg). Ainsi, lorsque nous avons songé à une approche qui ne serait pas limitée par la faible concentration protéique des échantillons, et qui permettrait de restreindre au maximum les étapes intermédiaires entre l'échantillon et le spectromètre de masse, nous avons pu envisager d'entreprendre l'analyse de la composition protéique globale par spectrométrie de masse des préparations de fantômes de globules rouges parasités dans de bonnes conditions.

Nous nous sommes tout d'abord interrogés sur la meilleure manière de limiter le bruit de fond lié à l'identification de protéines érythrocytaires lors des analyses de spectrométrie de masse, qui risque de masquer le signal correspondant aux protéines parasitaires. La technique du marquage métabolique est très utilisée chez *P. falciparum*, parce qu'elle permet un marquage sélectif des protéines parasitaires, car l'érythrocyte est incapable de synthèse protéique. Notre objectif a donc été de réaliser un marquage métabolique des protéines plasmodiales avec un composé qui serait détecté en spectrométrie de masse et permettrait de distinguer les protéines parasitaires des protéines érythrocytaires. La lysine deutérée, substituée par 4 atomes de Deuterium, a déjà été utilisée dans ce but (Gu, Pan *et al.* 2002), notamment par l'équipe de Thierry Rabilloud (Chevallet, Wagner *et al.* 2003). Le choix de la lysine présente plusieurs avantages. Tout d'abord, en raison de la spécificité de clivage de la trypsine, qui coupe une chaîne protéique après un résidu lysine ou arginine, la digestion par la trypsine des protéines marquées génère des peptides contenant au plus un résidu lysine. Par ailleurs, si la lysine deutérée (LysD4) est présente en quantité limitante dans le milieu de culture, à une concentration telle que 50 % des lysines incorporées sont deutérées, les peptides issus des protéines marquées apparaissent, lors des études de spectrométrie de masse, sous la forme de doublets dont la masse diffère de 4 Da (ou 8 Da en cas de clivage manqué par la trypsine), et dont le rapport d'intensité est proche de 1. Cette technique de marquage s'avère donc particulièrement intéressante dans le cadre de notre étude. En effet, seules les protéines parasitaires incorporent la lysine deutérée, et si celles-ci sont spécifiquement reconnues en spectrométrie de masse, il devient alors possible de restreindre les analyses de spectrométrie de masse en tandem à elles seules, ce qui constitue une économie de temps et de moyens conséquente. Par ailleurs, l'analyse de ces échantillons peut se faire après une électrophorèse SDS-PAGE classique, ce qui permet de limiter les pertes de protéines par rapport à l'électrophorèse bidimensionnelle.

Pour l'ensemble de ces raisons, nous avons appliqué cette technique de marquage métabolique différentiel avec de la lysine deutérée à une culture synchrone de *P. falciparum*, et nous avons

procédé à une analyse par spectrométrie de masse de la préparation de fantômes érythrocytaires issue de cette culture marquée. Afin que la LysD4 constitue 50 % des résidus lysine incorporés durant le marquage, les parasites ont été cultivés dans un milieu dont deux tiers des molécules de lysine étaient deutérées, en prenant en compte le fait que le parasite incorpore des acides aminés issus du milieu extérieur et aussi de la dégradation de l'hémoglobine. Le marquage a été réalisé sur une culture synchrone de *P. falciparum*, pendant une durée de 24 heures, entre les stades trophozoïte jeune et trophozoïte mûr/schizonte jeune. Des fantômes de globules rouges parasités ont été préparés à partir de cette culture, et ont été soumis à une extraction protéique totale, en SDS et DTT (dithiothreitol). Les protéines ont été séparées par électrophorèse SDS-PAGE unidimensionnelle, et nous avons découpé le gel en bandes de façon systématique, en respectant les bandes visibles après coloration au bleu de Coomassie colloïdal, mais en ne nous limitant pas à celles-ci. Les protéines ont été excisées du gel, digérées à la trypsine, et soumises à une analyse par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse et spectromètre de masse en tandem (nanoLC-MS/MS).

Nous avons ainsi identifié 78 protéines parasitaires au sein de ces préparations de fantômes de globules rouges parasités. L'analyse précise de leur fonction, prédite ou démontrée, s'est avérée riche en informations sur les rôles biologiques potentiels des structures de Maurer. Nous avons par ailleurs caractérisé sept protéines hypothétiques, dont nous avons montré que six sont localisées dans les structures de Maurer. Ces travaux et les résultats obtenus sont regroupés dans l'article ci-dessous, actuellement sous presse dans *Molecular and Cellular Proteomics*.

Article 4 : Proteomic analyses identify novel proteins of the Maurer's clefts, a secretory compartment delivering *Plasmodium falciparum* proteins to the surface of its host cell

Proteomic Analysis Identifies Novel Proteins of the Maurer's Clefts, a Secretory Compartment Delivering *Plasmodium falciparum* Proteins to the Surface of Its Host Cell*[S]

Laetitia Vincensini‡§, Sophie Richert¶‖, Thierry Blisnick‡, Alain Van Dorsselaer¶, Emmanuelle Leize-Wagner¶, Thierry Rabilloud, and Catherine Braun Breton‡ ‡‡§§**

A novel method was validated for the efficient distinction between malaria parasite-derived and host cell proteins in mass spectrometry analyses. This method was applied to a ghost fraction from *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes containing the red blood cell plasma membrane, the erythrocyte submembrane skeleton, and the Maurer's clefts, a Golgi-like apparatus linked to and addressing parasite proteins to the host cell surface. This method allowed the identification of 78 parasite proteins. Among these we identified seven novel proteins of the Maurer's clefts based on immunofluorescence studies and proteinase K digestion assays. The products of six contiguous genes located on chromosome 5 were identified, and the location within the Maurer's clefts was established for two of them. This suggests a clustering of genes encoding Maurer's cleft proteins. Our study sheds new light on the biological function of the Maurer's clefts, which are central to the pathogenesis and to the intraerythrocytic development of *P. falciparum*.
Molecular & Cellular Proteomics 4:582–593, 2005.

Upon invasion of the red blood cell, *Plasmodium falciparum*, the most life-threatening species of parasites causing human malaria, establishes a parasitophorous vacuole inside which it develops. The parasite nevertheless interacts with its host cell and its environment by exporting a membrane network into the cytoplasm of its host cell (1). Maurer's clefts are part of this network extending or budding from the parasitophorous vacuole membrane surrounding the growing parasite; electron microscopy studies detect them as flattened elongated vesicles close to the red cell plasma membrane (2). Since the characterization of PfSBP1,[1] a Maurer's cleft transmembrane protein, which allowed precise identification of these structures (3), Maurer's clefts have been the subject of several studies revealing very interesting features. Maurer's clefts have characteristics of a Golgi-like secretory compartment exported into the host cell cytoplasm and trafficking parasite proteins to the red cell membrane (4–8). One of their important roles is in the assembly of the cytoadherence complex, a function particularly significant to the pathogenesis of severe malaria. Interestingly we have shown recently that Maurer's clefts are also implicated in merozoite release, which depends on the phosphorylation status of the Maurer's cleft transmembrane protein PfSBP1, which is modulated by a parasite type 1 phosphatase located in the lumen of the clefts.[2]

Because the Maurer's clefts are linked to the red cell plasma membrane throughout the intraerythrocytic parasite development, they can be recovered together with a ghost preparation containing the erythrocyte plasma membrane and submembrane skeleton (3). To better understand the biological role of the Maurer's clefts and possibly identify novel putative drug targets, we performed a global MS proteomic analysis of *P. falciparum*-infected ghost preparations. Because *P. falciparum* is an obligate intracellular parasite, it is not possible to fractionate parasite-derived proteins away from erythrocyte proteins, and this is a drawback for systematic MS analyses. In this study, we showed that isotope metabolic labeling is a quick and efficient method for differentiation of parasite- *versus* host cell-derived proteins. Our

From the ‡Unité de Biologie des Interactions Hôte-Parasite, CNRS URA 2581, Institut Pasteur, 25–28 Rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, the ¶Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique, 25 rue Becquerel, 67087 Strasbourg Cedex 2, the **Laboratoire de Bioénergétique Cellulaire et Pathologique, Commissariat à l'Energie Atomique Grenoble, 17 rue des martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, and ‡‡UMR 5539 CNRS-Université Montpellier 2, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 5, France

Received, November 10, 2004, and in revised form, January 21, 2005

Published, MCP Papers in Press, January 24, 2005, DOI 10.1074/mcp.M400176-MCP200

[1] The abbreviations used are: PfSBP1, *P. falciparum* skeleton-binding protein 1; MS/MS, tandem mass spectrometry; nano LC, nanoscale capillary liquid chromatography; GST, glutathione *S*-transferase; PfPDI, *P. falciparum* protein-disulfide isomerase; STEVOR, sublelomeric variable open reading frame; HRP1, histidine rich protein 1; VTS, vacuolar transport signal; SERA, serine rich antigen; RESA, ring-infected erythrocyte surface antigen; EXP, exported protein.

[2] Blisnick, T., Vincensini, L., Fall, G., and Braun Breton, C. (2005) LANCL1, an erythrocyte protein recruited to the Maurer's clefts during *Plasmodium falciparum* development. *Mol. Biochem. Parasitol.*, in press.

© 2005 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.
This paper is available on line at http://www.mcponline.org

TABLE I

Sequence of the primers used for the PCR amplification of selected gene fragments to express GST-recombinant proteins

The proteins have been named according to the locus annotated in the *Plasmodium* data base. The added EcoRI and BamHI restriction sites are underlined in the primer sequence. The protein region expressed as a GST-recombinant polypeptide is indicated by its amino- and carboxyl-terminal amino acids.

Locus	Protein name	Primers	Expressed region
PF10_0013	PfJ13	5′-CgCAAggATCCAATTTAggAgATTCATTg 3′-CACTgAATTCTTgTTCATATAACTTACg	Asn^{108}–Gln^{193}
PF10_0023	PfJ23	5′-gATATgggATCCTTAAATCCTTATggTTC 3′-ggATTATTgAATTCCACTTCAACTg	Asp^{97}–Glu^{191}
PFE0060w	PfE60	5′-gAAggATCCgATCAATTTTTACAAACg 3′-CTgggAATTCTTgACCTACCATTTgAgg	His^{103}–Gln^{256}
PFD0080c	PfD80	5′-gCATggATCCgATAgAACAAAAACATTTTC 3′-gAACgAATTCCCATgCTTgTTCAgATTC	Asp^{371}–Trp^{495}
PF10_0323	PfJ323	5′-gATATgggATCCTTAAATCCTTATggTTC 3′-ggTgAATTCTCCACTTgATCTTCCT	Leu^{244}–Gly^{345}
PFA0680c	PfA680	5′-CACAggATCCAAACCATTCggAAATACC 3′-CATTTgAATTCATTTTgCATACgAAgATgC	Lys^{53}–Asn^{143}
MAL7P1.174	PfG174	5′-gTgAAggATCCAAgAATgTAAAAgATgg 3′-gTTCTCgAATTCTTgTACTATTCTTgTCC	Lys^{70}–Gln^{167}

proteomic analysis confirmed that ghost preparations are valuable to study Maurer's clefts and enabled us, together with localization and topological studies, to identify new Maurer's clefts proteins, providing insight into the biology of these interesting organelles.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Parasite Culture and Deuterium Labeling—*P. falciparum* 3D7 strain was grown *in vitro* under standard culture conditions (9). For the deuterium labeling experiment, parasites at the ring stage were grown for 24 h at 37 °C in standard culture medium supplemented with 0.875 mM DL-lysine 4,4,5,5-d_4 (Isotec, Miamisburg, OH) (10). Mature trophozoites and schizonts were then harvested by Plasmion floatation (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Germany) (11).

Preparations of Ghosts from Infected Erythrocytes—Infected erythrocytes were washed extensively in RPMI 1640 medium and lysed in hypotonic buffer as described previously (3). The lysate was then separated by centrifugation into a cytosolic fraction and a pellet containing ghosts and free parasites; ghosts were recovered from the pellet as described previously (3) and stored as a pellet at −20 °C or incubated in PBS for 30 min at 37 °C and further handled for indirect immunofluorescence assays.

Sample Preparation for Mass Spectrometry Analyses—Deuterium-labeled infected red blood cell ghost proteins were extracted by incubation in Laemmli sample buffer (12) for 10 min and extensive vortexing. Proteins were then separated by SDS-PAGE in a 10% polyacrylamide gel and stained with Biosafe Coomassie (Bio-Rad). Sixty-seven bands were excised from the gel and frozen for further MS analyses.

Mass Spectrometry Analyses—Separated gel bands were subjected to tryptic digestion overnight at room temperature in 25 mM ammonium bicarbonate buffer. The resulting peptides were extracted from the gel and analyzed by nanoscale capillary liquid chromatography-tandem mass spectrometry (nano LC-MS/MS). Purification and analysis were performed on a C_{18} capillary column (PepMap, LC Packings, Sunnyvale, CA) using a CapLC capillary LC system (Waters, Milford, MA) coupled to a hybrid quadrupole orthogonal acceleration time-of-flight tandem mass spectrometer (Q-TOF II, Micromass, Manchester, UK). The LC-MS union was made with a PicoTip (New Objective, Woburn, MA) fitted on a ZSPRAY (Micromass, Beverly, MA) interface. Chromatographic separations were conducted on a reversed-phase capillary column (PepMap C_{18}, 75-μm inner diameter, 15-cm length; LC Packings, Voisins le Bretonneux, France) with a 200 nl min^{-1} flow. The gradient profile used consisted of a linear gradient from 95% A (H_2O, 0.05% HCOOH) to 45% B (acetonitrile, 0.05% HCOOH) in 35 min followed by a linear gradient to 95% B in 1 min. Mass data acquisitions were piloted by MassLynx software using automatic switching between MS and MS/MS modes. The internal parameters of Q-TOF II were set as follows. The electrospray capillary voltage was set to 3.0 kV, the cone voltage was set to 30 V, and the source temperature was set to 80 °C. The MS survey scan was *m/z* 300–1500 with a scan time of 1 s and an interscan time of 0.1 s. When the intensity of a peak rose above a threshold of 8 counts, tandem mass spectra were acquired. Normalized collision energies for peptide fragmentation were set using the charge-state recognition files for +1, +2, and +3 peptide ions. The scan range for MS/MS acquisition was from *m/z* 50 to 1500 with a scan time of 3 s and an interscan time of 0.1 s. Fragmentation was performed using argon as the collision gas and with a collision energy profile optimized for various mass ranges of precursor ions. Mass data collected during a nano LC-MS/MS analysis were processed and converted into a Pocket Builder Library file and then fed into the search engine Mascot (Matrix Science, London, UK) (13). The data were searched against Swiss-Prot and TrEMBL data bases with trypsin plus potentially one missed cleavage. All proteins present in the data base were taken into account without any pH_i and molecular mass restriction. In addition to substitution with deuterated lysine, other putative modifications were taken into account, such as carbamidomethylation of cysteine and oxidation of methionine. The peptide mass error was limited to 0.25 Da in MS mode and 0.5 Da in MS/MS mode for nano LC-MS/MS data.

Expression of Recombinant Proteins and Production of Specific Antibodies—Different fragments of the selected proteins were amplified from *P. falciparum* 3D7 genomic DNA using the corresponding primers (Table I). The resulting PCR products were ligated into the pGEX-B vector and expressed in *Escherichia coli* BL21 cells (Stratagene, La Jolla, CA) as glutathione *S*-transferase (GST) fusion proteins (14), which were purified on glutathione-agarose beads as described previously (15). Specific antibodies were obtained by immunization of BALB/c mice as described previously (3).

Protein Immunodetection—Immunoblotting assays were performed as described previously (3). The new specific sera were used

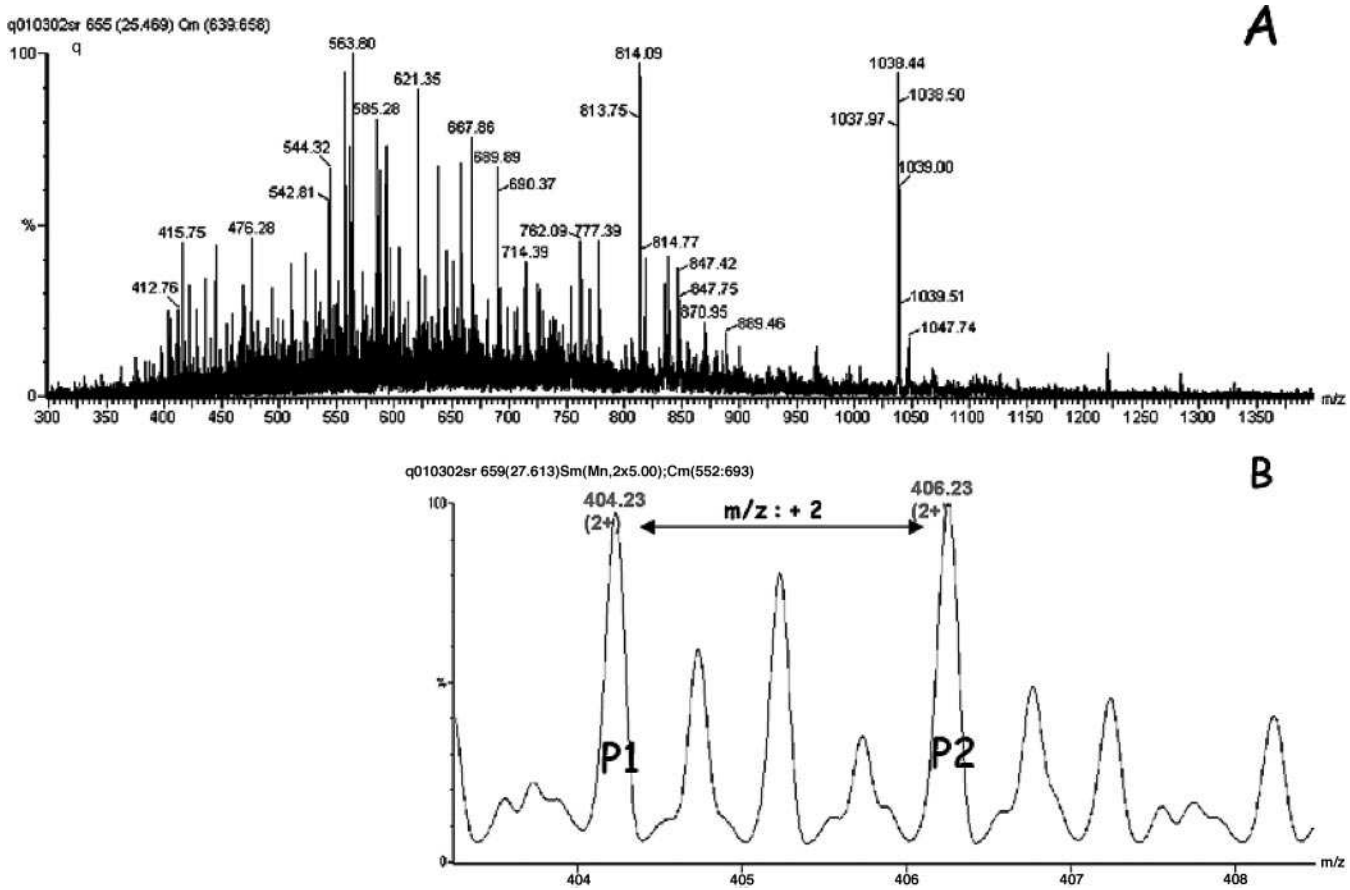


FIG. 1. **An example of a nano LC Q-TOF mass spectrum.** *A*, the spectrum of the tryptic digest of band 17 containing the RESA-like protein is presented. *B*, enlargement of the peaks corresponding to a selected peptide of this protein; the two peaks with a 4-Da mass difference (*m/z* +2) and a peak intensity ratio close to 1 are identified as *P1* and *P2* for the unlabeled and labeled peptides, respectively. Only such doublets were taken into account for the Mascot search.

at a 1:50 dilution. Indirect immunofluorescence assays were performed on air-dried samples as described previously (3). Sera were used at a 1:200 dilution.

Proteinase K Digestion of Ghost Preparations—Ghost preparations from *P. falciparum*-infected erythrocytes were subjected to proteinase K digestion as described previously (3). The resulting samples were analyzed by Western blotting using specific sera as indicated.

RESULTS

Mass Spectrometry Analysis of Deuterium-labeled P. falciparum-infected Red Blood Cell Ghosts—Ring stage *P. falciparum*-infected erythrocytes were matured for 24 h to late trophozoites and young schizonts in the presence of deuterated lysine (see "Experimental Procedures"). Because erythrocytes do not synthesize proteins, parasite-derived proteins were specifically labeled. Deuterated lysine, DL-lysine 4,4,5,5-d_4, was added at twice the concentration of cold lysine used in the cell culture medium: 0.876 mM for an equivalent of 0.438 mM L-lysine 4,4,5,5-d_4. With two-thirds of the lysine in the medium being labeled and taking into consideration that hemoglobin contains nearly 10% lysine, we estimated that ~50% of the lysines that were incorporated into parasite proteins during the labeling were deuterated. To enrich infected erythrocyte preparations with Maurer's clefts proteins, deuterium-labeled mature trophozoites and young schizonts (33 to 40 h postinvasion) were harvested by Plasmion floatation, and ghosts were recovered following cell hypotonic lysis (see "Experimental Procedures"). Previous work has shown that infected erythrocyte ghosts are devoid of detectable contamination with proteins of the parasite cytoplasm and the parasite membrane, but they do contain Maurer's clefts linked to the erythrocyte membrane (3). PfSBP1 was used as a positive control to confirm the presence of the Maurer's clefts. Ghost proteins were then extracted in sample buffer and processed by SDS-PAGE. Sixty-seven bands were cut from the gel and trypsin-digested, and the resulting peptides were analyzed by MS.

Because trypsin specifically cleaves after lysine and arginine residues, resulting peptides cleaved after a lysine residue contain usually one and no more than two lysine residues in case of a missed cleavage. Moreover, as only 50% of the lysines incorporated into parasite proteins during the labeling are deuterated, such peptides that are derived from parasite proteins may exist in two forms, deuterated or not deuterated,

TABLE II

Proteins identified from P. falciparum-infected red blood cell ghosts by tandem mass spectroscopy

The peptides were assigned by Mascot analysis, and the corresponding proteins were categorized into four classes depending on predicted signal peptide (SP) and transmembrane domains (TMD). The gene locus as annotated in the *Plasmodium* data base (www.plasmodb.org) is indicated for each identified protein. The protein names or putative function (protein description), their predicted molecular mass (MM), and calculated pH_i as determined using DNAStrider™1.3 (Commissariat à l'Energie Atomique, Saclay, France) are indicated. The final two columns give the number of peptides identified in the mass spectrum and the percentage of coverage of the total protein sequence of those peptides.

Locus	Protein description	Predicted				No. of peptides	Coverage
		SP	TMD	MM	pH_i		
				kDa			%
Class A							
PF11_0183	GTP-binding protein Ran/TC4	0	0	24.9	8.46	5	43
PF10_0121	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase	0	0	26.3	8.24	6	22
PF10_0086	Adenylate kinase	0	0	27.6	9.5	5	26
PF14_0378	Triose-phosphate isomerase	0	0	27.9	6.22	2	8
MAL8P1.69	14-3-3 protein	0	0	29.5	4.85	7	54
MAL13P1.214	Phosphoethanolamine *N*-methyltransferase	0	0	31	5.5	3	15
PF08_0019	GTP-binding protein Rack	0	0	35.7	6.61	5	25
PF14_0598	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0	0	36.6	8.32	9	59
PF14_0425	Fructose-bisphosphate aldolase	0	0	40.1	8.77	6	38
PF14_0434	Hypothetical protein	0	0	41.9	9.56	2	8
PF11_0351	Heat shock protein, 70 kDa, homologue	0	0	73.3	6.7	5	27
PF08_0054	Heat shock protein, 70 kDa	0	0	73.9	5.55	5	22
Class B							
PFE0760w	Hypothetical protein	0	1	17.1	7.8	4	41
PFE0660c	Purine-nucleoside phosphorylase	0	1	26.8	6.4	3	27
PFD1170c	RESA-like protein	0	1	35.9	9.02	12	48
PFE0065w	PfSBP1	0	1	36.3	4.25	2	10
PFL0780w	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	0	1	41.2	7.7	2	ND[a]
PF10_0155	Enolase	0	1	48.6	6.4	6	28
MAL6P1.160	Pyruvate kinase	0	1	55.6	8.17	1	7
PFE1600w	Hypothetical protein	0	1	60.1	4.86	3	19
PF07_0029	PfHsp86	0	1	86.1	4.8	3	16
PF10_0023	Hypothetical protein (PfJ23)	0	3	32.1	7.7	2	33
PF10_0366	ADP/ATP transporter on adenylate translocase	0	3	33.7	10.3	4	14
Class C							
PF10_0013	Hypothetical protein (PfJ13)	1	0	27.6	9.36	4	49
PFE0050w	Hypothetical protein	1	0	30.7	7.8	8	49
PF14_0678	EXP2	1	0	33.4	5.07	10	32
PF13_0141	L-Lactate dehydrogenase	1	0	34.1	7.7	9	58
MAL7P1.174	Hypothetical protein (PfG174)	1	0	37.7	9.19	4	20
PF13_0197	Merozoite surface protein 7	1	0	41.3	4.63	3	14
PFE0075c	Rhoptry-associated protein	1	0	47	8.97	4	22
PFE0055c	Heat shock protein	1	0	47.7	8.52	4	22
PF11_0055	Hypothetical protein	1	0	49.2	9.72	2	10
MAL8P1.17	Disulfide isomerase precursor	1	0	55.5	6.07	3	13
PFB0100c	HRP1	1	0	71.3	9.9	4	22
PFI0875w	Heat shock protein	1	0	72.3	5.11	4	21
PFL0050c	Hypothetical protein	1	0	77.7	4.31	4	12
PFL1385c	ABRA	1	0	86.6	4.65	2	24
PF10_0159	GBP130 precursor	1	0	95.8	4.94	4	16
PFB0335c	SERA	1	0	103.9	6.4	2	22
PFB0340c	SERA	1	0	111.7	5.27	13	32
Class D							
PFD0310w	Sexual stage-specific protein precursor	1	1	16.6	7.8	2	33
PF11_0224	EXP1	1	1	17.3	7.8	5	29
PF10_0323[b]	Hypothetical protein (PfJ323)	1	1	44.3	10.62	2	25
PFL1070c	Endoplasmin homologue precursor	1	1	95	5.22	2	15
PFI1445w	RhopH2	1	1	161	8.76	4	28
PFI1475w	MSP1	1	1/GPI[c]	195.6	6.31	2	21
PFA0680c	Hypothetical protein (PfA680)	1[d]	2	26.9	10.7	4	42
PFE0060w	Hypothetical protein (PfE60)	1	2	48.1	7.09	5	24
PFD0080c	Hypothetical protein (PfD80)	1	3, 4	60.2	9.17	3	19
PF14_0541	V-type H^+-translocating pyrophosphatase	1	15	76.4	6.4	4	14

[a] Not determined.

[b] Annotated as chr10.gen_151.

[c] Glycosylphosphatidylinositol.

[d] As reannotated (40).

and have a molecular mass difference of 4 Da (if containing one lysine) or 8 Da (two lysines). These peptides thus appear in nano LC-MS/MS analyses as doublets with a mass shift of 4 or 8 Da and an intensity ratio of the two peaks characteristic of the labeling conditions (close to 1; Fig. 1). MS/MS analysis focused solely on such differentially labeled peptides. The Mascot software package (13) was used to take into account modifications such as deuterated lysine, thus excluding from the analysis major proteins devoid of this modification.

In total, 78 parasite proteins were identified including 28 proteins from the protein translation machinery (ribosomal proteins and translation initiation and elongation factors) that are classical contaminants in global proteomic studies due to their high abundance (16) (Supplemental Table 1). The remaining 50 identified proteins, listed in Table II, are divided into four classes (A–D) based on the presence or not of a signal peptide and/or transmembrane domains. Among these proteins, PfSBP1 is known to be a transmembrane protein of the Maurer's clefts (3). Interestingly, as illustrated by PfSBP1, a classical amino-terminal signal peptide (17) is not required to target a protein outside the parasite. Thus, to validate our approach and identify novel Maurer's cleft proteins, we selected seven hypothetical proteins of unknown function with high coverage in the MS analysis (20–49%) and from classes B–D corresponding to proteins harboring a signal peptide and/or a transmembrane domain. The selected proteins, PfA680, PfD80, PfE60, PfG174, PfJ13, PfJ23, and PfJ323, correspond to the PlasmoDB accession numbers PFA0680c, PFD0080c, PFE0060w, MAL7P1.174, PF10_0013, PF10_0023, and PF10_0323, respectively (Table II).

Detection of Proteins within the Infected Erythrocyte Ghost Fraction by Western Blotting—To confirm that the selected proteins are associated with the red blood cell ghost fraction we raised mice antibodies against GST fusion recombinant proteins (Table I). The corresponding sera were used in Western blotting experiments (Fig. 2). Preimmune sera did not react with erythrocyte or parasite proteins (not shown). Taking into account the cleavage of predicted signal peptides (Table III), proteins of approximately the expected size were detected in whole cell lysates of parasite-infected erythrocytes (Fig. 2, *lanes 1*) but not in uninfected erythrocyte lysates (Fig. 2, *lanes 3*). The apparent molecular masses of PfJ13 (20 kDa) and PfJ23 (25 kDa) are slightly lower than expected, and that of PfD80 (70 kDa) is slightly larger. Two polypeptides of 37 and 48 kDa were specifically detected for PfJ323, and the 37-kDa polypeptide was more abundant in the ghost fraction; this suggests a maturation of the PfJ323 protein correlated with its export outside the parasite. Importantly and concordant with their identification within the labeled ghost preparation, all these proteins were detected by Western blot in ghost preparations from *P. falciparum*-infected erythrocytes (Fig. 2, *lanes 2*). The same analysis was performed for the protein-disulfide isomerase (PfPDI). PfPDI-specific antibodies (a gift from P. Grellier) reacted with a protein of the expected molecular mass (50 kDa) in both the total extract and the ghost fraction from *P. falciparum*-infected red blood cells. The intensities of labeling specific for PfA680, PfJ23, and PfPDI on ghost *versus* total extracts from *P. falciparum*-infected cells suggest that these proteins are mainly not associated with the ghost fraction.

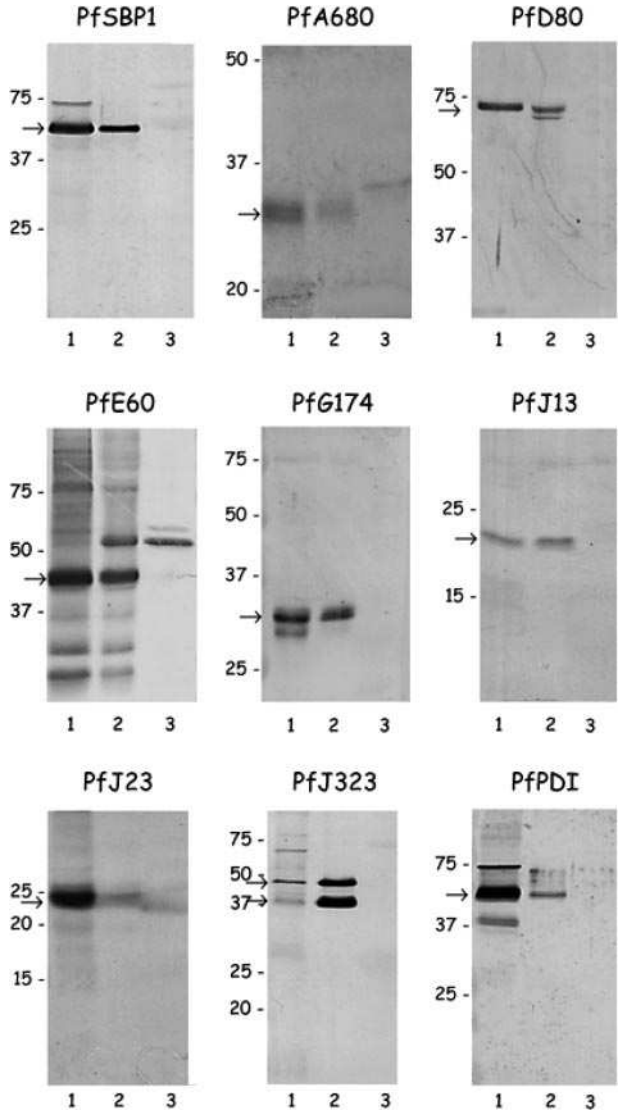


FIG. 2. **Subcellular allocation of the selected proteins.** Western blot analyses were performed using mouse antibodies raised against GST fusion proteins. *Lanes 1*, whole cell lysate of *P. falciparum*-infected erythrocytes; *lanes 2*, infected erythrocyte ghosts; *lanes 3*, whole cell lysate of uninfected erythrocytes. The samples correspond to 10^7 (total infected red blood cells), 3×10^7 (infected red blood cell ghosts) and 10^7 (red blood cells) erythrocytes, respectively. The specifically detected polypeptides are designated with *arrows*. Molecular mass markers are indicated (kDa).

Localization of the Selected Proteins by Immunofluorescence Microscopy—To determine the exact subcellular localization of the selected proteins, immunofluorescence studies were performed on air-dried *P. falciparum*-infected red blood

TABLE III

Summary of the data obtained for PfPDI and the seven selected hypothetical proteins

The predicted (taking into account cleavage of a predicted signal peptide) and observed (Western blot) molecular masses are indicated as well as the predicted VTS/Pexel motifs (38, 39). The association of the proteins with the infected red blood cell ghost fraction was determined by a Western blot comparative analysis of this fraction with a total infected red blood cell extract (+, detected in; ++, mainly associated with; +++, enriched in the infected red blood cell ghost fraction). The specific sera were used in immunofluorescence experiments (−, no labeling; +, specific labeling; ND, not done), and the observed pattern is indicated (MC, Maurer's clefts; PV, parasitophorous vacuole). Whether the domain of the protein reacting with the corresponding specific serum was (+) or was not (−) protected from proteinase K digestion is indicated.

Parasite protein	Molecular mass		VTS/Pexel motif	Detection in the ghost fraction	Immunofluorescence		Proteinase K protection
	Predicted	Observed			Labeling	Localization	
	kDa						
PfJ13	25	20	^{47}RLISE	++	−		+
PfJ23	30	25	^{39}KMIND	+	+	MC	+
PfE60	45	45	^{43}RTALD	++	+	MC	+
PfD80	56	70	^{46}RNLSE	++	−		+
PfJ323	45	37 and 48	^{183}KNINE	+++	+	MC + PV	−
PfA680	25	25	^{43}RMLAQ	+	+	MC + PV	+
PfG174	30	30	^{52}RILSE	++	−		−
PfPDI	50	50	^{65}RLIPE	+	ND		+

cells and resealed ghosts (Fig. 3) (see "Experimental Procedures"). None of the sera reacted with uninfected erythrocytes (not shown). The sera specific for PfJ13, PfD80, and PfG174 did not label infected red blood cells or infected erythrocyte ghosts using these methods (not shown). A labeling of both intact infected erythrocytes and ghosts was obtained with the sera directed against PfJ23, PfE60, PfJ323, and PfA680 (Fig. 3). Most interestingly, the pattern characteristic of the Maurer's clefts and observed for PfSBP1 was detected for PfJ23 and PfE60 in both intact erythrocytes and ghosts. Using PfA680-specific antibodies, a similar pattern was obtained for ghost preparations, whereas the vesicular-like and diffuse labeling of intact infected red cells is indicative of a dual location. PfJ323-specific antibodies also labeled vesicular-like structures in infected erythrocyte ghosts; however, this pattern seems slightly different from the characteristic pattern of Maurer's clefts.

Localization and Orientation of the Selected Proteins within the Erythrocyte Ghost Preparations—To further characterize the association of PfJ23, PfE60, PfJ323, and PfA680 with vesicles present in ghost preparations and to specify the location of PfJ13, PfD80, and PfG174, proteinase K digestion experiments were performed on intact (Fig. 4, *lanes 3*) and Triton X-100-ruptured (Fig. 4, *lanes 4*) ghosts (see "Experimental Procedures"). The selected proteins were detected by Western blot using specific antibodies. When Triton X-100 was added together with proteinase K, none of the proteins were detected, indicating their sensitivity to proteolysis in detergent-lysed ghost preparations. PfJ323 and PfG174 were not detected following addition of proteinase K in the absence of detergent. However, full-length PfJ13, PfPDI, PfA680, PfJ23, and PfE60 and a degradation fragment of PfD80 were detected under the same conditions, establishing their association with closed vesicles. The degradation of PfG174 indicates that the hypotonic buffer prevents the resealing of erythrocyte plasma membrane vesicles; the protection of others, including PfSBP1 (Supplemental Fig. 1), indicates that Maurer's cleft closed vesicles are recovered with the ghost fraction (3).

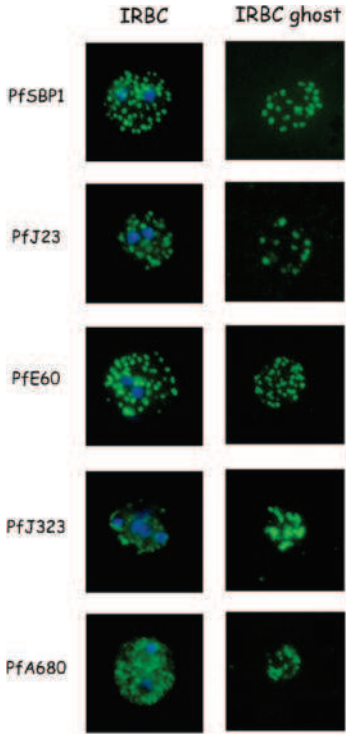


FIG. 3. **Indirect immunofluorescence of *P. falciparum*-infected erythrocytes and infected red blood cell (*IRBC*) ghosts.** Air-dried infected red blood cells and infected red blood cell ghosts were incubated with mouse antibodies raised against GST fusion proteins as indicated. The nuclei were stained with 4′,6-diamidino-2-phenylindole (*blue*). Negative controls were performed using preimmune sera and anti-GST antibodies (not shown).

Consequently we propose a topology model for the selected proteins based on these results, on transmembrane predictions, and the specificity of the antibodies (Fig. 5).

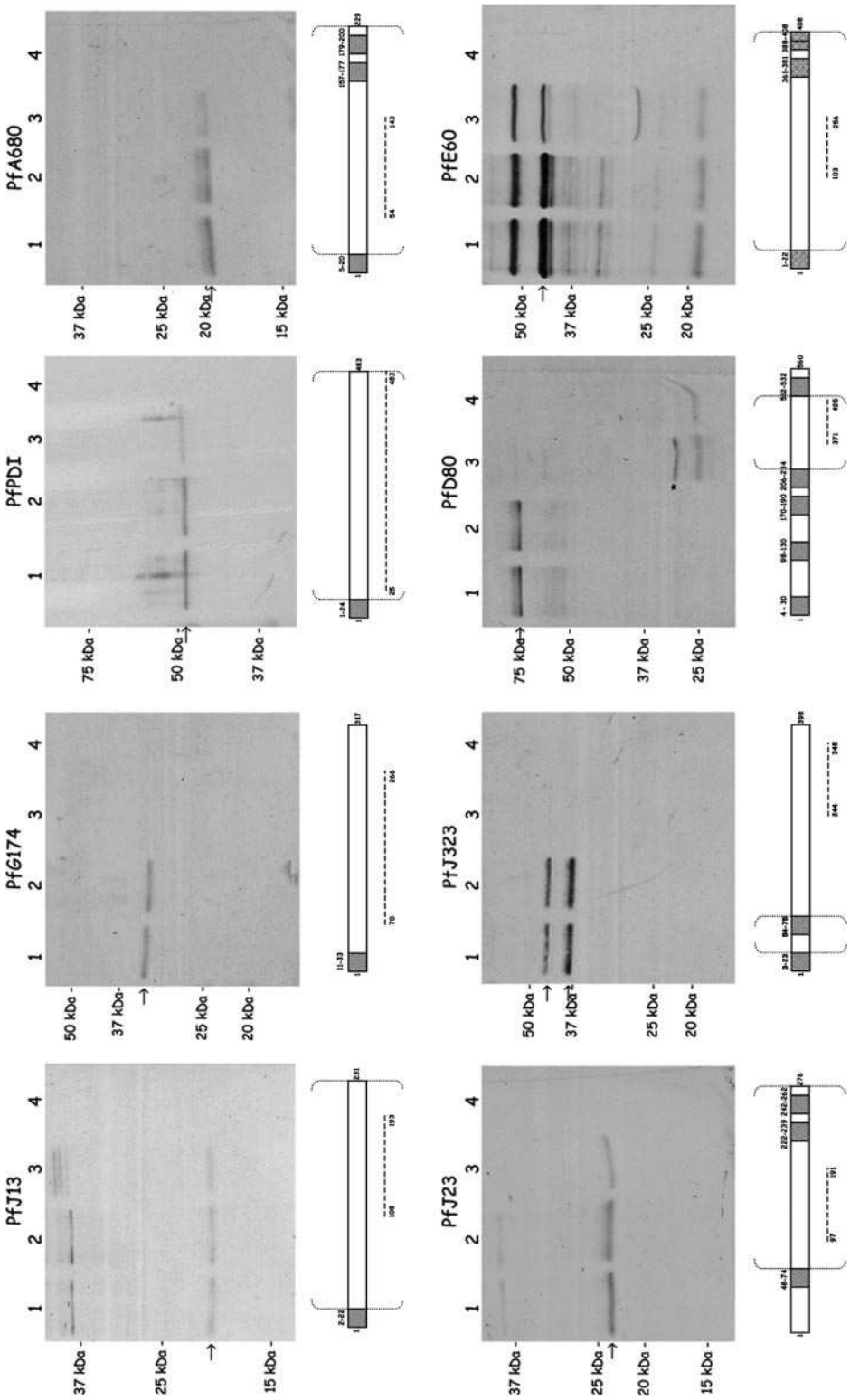


FIG. 4. **Topology analysis of the selected proteins within infected erythrocyte ghost preparations.** Ghosts were prepared from Plasmion-enriched trophozoites and schizonts and incubated in RPMI 1640 medium (*lanes 1*) or RPMI 1640 medium supplemented with 0.5% Triton X-100 (*lanes 2*), 5 mg ml^{-1} proteinase K (*lanes 3*), and 0.5% Triton X-100 and 5 mg ml^{-1} proteinase K (*lanes 4*). The digest products were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting using mouse antibodies specific for the selected proteins as indicated. Molecular mass markers are indicated (kDa). Schematic drawings of the protein sequences are presented with predicted signal peptide and transmembrane domains (*hatched boxes*). Only transmembrane domains predicted by at least two of three prediction softwares (TMAP, bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/tmap.html; TMPRED, www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html; TOPRED, bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/toppred.html) were considered. The protein region used to raise specific antibodies is *underlined* by *dotted lines*, and the protein regions protected from proteinase K digestion are indicated in *brackets*. Full-length proteins are indicated by an *arrow*, and degradation products are indicated by an *asterisk*.

PfG174, PfJ13, and PfPDI have a predicted signal sequence but no putative transmembrane domain. Because PfG174 was fully degraded in the absence of Triton X-100, it is likely located in the red cell cytoplasm, while its recovery together with the ghost fraction suggests that PfG174 is at least transiently associated with the Maurer's clefts or the erythrocyte plasma membrane. PfJ13 and PfPDI were protected from proteolysis indicating their localization in the lumen of closed vesicles.

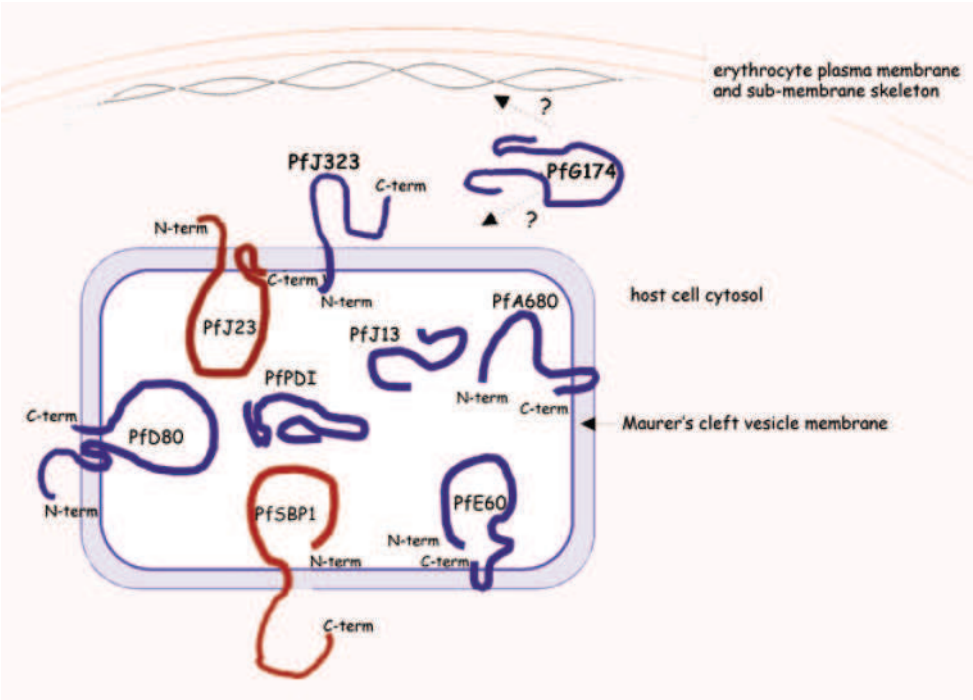


FIG. 5. **Schematic representation of the topology of the selected proteins within ghost preparations.** The selected proteins and PfSBP1 have been assigned to the Maurer's cleft membrane or lumen or to the red cell cytosol according to their behavior in proteinase K digestion experiments and the location of predicted transmembrane domains. The location of the amino and carboxyl termini is presented for the transmembrane proteins. Proteins with a predicted signal peptide are represented in *blue*, and proteins without a signal peptide are in *red*.

PfJ323, PfD80, PfE60, and PfA680 have a predicted signal peptide and transmembrane domain(s). Based on the specificity of the PfJ323 antibodies and the lack of detection of a degradation product in the absence of detergent, the carboxyl-terminal region of PfJ323 is likely to be located in the red cell cytoplasm. For PfD80, a degradation product of 30-kDa was detected, concordant with the location of the Pro^{235}–Lys^{511} region of the protein in the lumen of closed vesicles. The size of this degradation product also strengthens the TMPRED prediction of a His^{512}–Tyr^{532} transmembrane domain. Finally full-length PfE60 and PfA680 were observed following proteinase K treatment, indicating that the amino-terminal region of these proteins, which is detected by the specific antibodies, is located in the lumen of closed vesicles. For both proteins, two transmembrane domains separated by only two to six residues are predicted close to their carboxyl terminus. These very short stretches are not likely to be accessible to proteolysis, thus explaining the detection of full-length proteins. Based on the same rationale, we propose that the central loop of PfJ23 (Asn^{75}–Lys^{221}) is located in the lumen of closed vesicles.

DISCUSSION

Mass Spectrometry Identification of Deuterium-labeled P. falciparum Maurer's Cleft Proteins—Our proteomic study focused on Maurer's clefts, a Golgi-like compartment linked to the erythrocyte plasma membrane. They are recovered together with the red cell plasma membrane and submembrane skeleton as infected erythrocyte ghost preparations. We studied these preparations using a method based on metabolic labeling with deuterated lysine that allows distinction between host cell- and parasite-derived proteins in MS analyses. Because only 50% of the lysine residues incorporated into newly synthesized proteins were deuterated, peptides originating from parasite-derived proteins cleaved after a lysine residue appeared as doublets with a mass difference of 4 Da (or 8 Da in the case of a missed cleavage). When the Mascot search was restricted to such peptides, only parasite proteins were identified, validating our approach for an efficient and quick identification of parasite proteins. This approach has the advantage of limiting the number of Mascot searches, therefore increasing the efficiency and precision of protein identification. Nevertheless this approach was not too restrictive as the access to other species was conserved, allowing the identification of proteins by homology in case the *P. falciparum* genome data base missed some coding regions.

From 67 polyacrylamide gel slices, 78 parasite proteins were identified from ghost preparations. Twenty-eight ribosomal proteins or translation factors were identified as well as five *P. falciparum* glycolytic enzymes (Supplemental Table 1). Parasite protein synthesis and the entire glycolytic pathway take place in the parasite cytosol, and the identification of these proteins in the ghost preparation suggests that a small fraction of infected erythrocytes is completely lysed when

ghosts are being prepared. Nevertheless ribosomal proteins are known to be very abundant in eukaryotic cells, and they are notorious contaminants of global proteomic studies (except following two-dimensional gel separation because of their basic pH_i). Similarly glycolytic enzymes are particularly abundant in *P. falciparum* extracts. Indeed microarray studies showed that the lactate dehydrogenase gene transcript is 10 times more abundant than the transcript of HSP70 and 100 times more abundant than that of actin (16). This is consistent with the observed increased glucose consumption by 30–50-fold following erythrocyte infection by *P. falciparum* (18). However and concordant with its recovery in the ghost fraction, it has been recently proposed that, in mammals, the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is also involved in vesicular transport (19, 20).

Our study identified proteins that have been described as Maurer's cleft proteins (PfSBP1 (3)) or as transiently associated with Maurer's clefts (HRP1 (7, 21)). On the other hand, several proteins known to be associated with the Maurer's clefts were not detected within the ghost preparations: PfEMP1 (7), PfEMP3 (7, 22), and the PfSEP (23) and STEVOR proteins (24). As no protein over 187 kDa and under 12 kDa was identified, PfEMP1 (200–400 kDa) and PfEMP3 (273 kDa) should not have entered the 10% polyacrylamide gel, while the SEP proteins (12–16 kDa) might have run out of the gel. The lack of detection of the STEVOR proteins may be related to the timing of their translocation, although they have been described to be located in the Maurer's clefts in late trophozoites and early schizonts (24). Alternatively it can illustrate the inefficient recovery of peptides from STEVOR proteins for the MS analysis.

Five proteins of the parasitophorous vacuole were identified: SERA3, SERA4 (25), ABRA (26), and EXP1 and EXP2 (27). It is unclear whether the Maurer's clefts and the parasitophorous vacuole form a continuous membrane network in the erythrocyte cytoplasm, joining the parasite cytoplasm and the red blood cell membrane together, or whether proteins are transferred across these two compartments by vesicular transport (28, 29). While the latter hypothesis is supported by the presence of secretory vesicle components in the Maurer's clefts (5–7, 30), some data also suggest that the Maurer's clefts constitute specialized domains of the parasitophorous vacuole membrane (31). In any case, only a limited number of proteins are trafficked between these two compartments. Indeed only 10 proteins are common to our study and a proteomic study of the parasitophorous vacuole[3]: two glycolytic enzymes (triose-phosphate isomerase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), SERA4, three heat shock proteins (PfHsp86 and proteins encoded by the PF11_0351 and PF08_0054 loci), GBP130, the merozoite surface protein 7, an endoplasmin homologue, and the protein-disulfide isomerase. In addition, two proteins of the parasitophorous vacuole membrane identified in our study, EXP1 and EXP2, have been shown to be exported to a parasite-derived compartment within the erythrocyte cytosol (27, 32). These observations strengthen the validity of this proteomic study.

Characterization of Seven Novel Maurer's Cleft Proteins (Table III)—Our proteomic study identified 13 hypothetical proteins, putatively located in the Maurer's clefts and expressed in *P. falciparum* blood stages (16, 33). Sera were raised against seven of these hypothetical proteins and specifically detected each of the relevant proteins by Western blot in infected erythrocyte ghosts. Indirect immunofluorescence studies were also performed. The pattern observed for PfE60 and PfJ23 clearly indicates that the proteins are associated with Maurer's clefts. Alternatively PfA680 and PfJ323 were detected outside the parasite both with a Maurer's cleft pattern and a more diffuse labeling of the parasitophorous vacuole, suggesting a dual localization. Immunoelectron microscopy studies should be performed to address this matter. The location of the hypothetical proteins and/or their orientation within closed vesicles of the ghost preparations was then investigated with proteinase K digestion experiments. The predicted soluble protein PfG174 was fully degraded by proteinase K in the absence of detergent. Thus PfG174 is likely to be located in the red cell cytosol. Whether PfG174 is soluble in the erythrocyte cytosol or associated with a membrane or the submembrane skeleton requires further investigation. Five of the selected proteins were at least partially protected from proteinase K digestion, concordant with their association with closed vesicles as presented Fig. 5. Maurer's clefts are the only parasite-derived membrane structures identified in ghost preparations, and they form closed vesicles following the hypotonic lysis of infected erythrocytes as shown by the inaccessibility of the amino-terminal domain of PfSBP1 to proteinase K in the absence of detergent (Supplemental Fig. 1 and Ref. 3). Taken together, our results suggest that PfA680, PfD80, PfE60, and PfJ23 are transmembrane proteins of the Maurer's clefts, while PfJ13 and PfPDI are soluble proteins in the lumen of the Maurer's clefts. PfJ323 was not detected following proteinase K treatment indicating that its carboxyl-terminal domain, against which the antibodies were raised, is in the red cell cytoplasm. Because immunofluorescence studies located PfJ323 in vesicular structures, we propose that PfJ323 is a transmembrane protein of the Maurer's clefts.

A complementary study has been published recently using a multidimensional protein identification technology (MudPIT) to identify surface proteins from *P. falciparum*-infected erythrocytes (34). Following surface biotinylation of mature schizonts or trophozoites, subcellular fractions were prepared by sedimentation following hypotonic lysis. These fractions should contain the red cell plasma membrane and submembrane skeleton as well as Maurer's clefts. The biotinylated proteins were recovered by affinity chromatography on a streptavidin column and processed for MS analysis. Among the 36 identified proteins considered by the authors as po-

[3] K. Lingelbach and J. Nyalwidhe, personal communication.

tential parasite-infected erythrocyte surface proteins, four were also identified in our study: PfE60/PIESP2, PfJ323, PfG174, and PfE50 (product of gene PFE00050w). We showed that PfE60/PIESP2 and PfJ323 are transmembrane proteins of the Maurer's clefts; Florens and colleagues (34) also determined that PfE60/PIESP2 may be associated with the red cell membrane. Consequently, like PfEMP1, PfE60/PIESP2 might be transiently associated with the membrane of the Maurer's clefts and then translocated to the red cell surface. Alternatively, because schizonts might be slightly permeable to biotin (35), submembrane proteins of the infected erythrocyte, including transmembrane proteins of the Maurer's clefts, might have been labeled. Concordant with this permeability of the erythrocyte membrane is the accessibility of HRP1 to specific antibodies in late schizonts (36). This would also explain the labeling of PfG174 that we located in the red cell cytosol.

Trafficking of Proteins to the Maurer's Clefts—Overall the Maurer's cleft proteins we identified have varied topologies (Fig. 5). Because PfA680, PfE60, and PfJ323 display a signal peptide and have the same topology within the clefts, they should be trafficked to this compartment via the same pathway. However, while PfD80 has a signal peptide, its topology is different. Similarly PfSBP1 and PfJ23 lack a signal peptide but have an odd number of transmembrane domains, yet their orientation in the Maurer's clefts is different. Because a recent study showed that the trafficking of parasite-derived proteins in the host erythrocyte depends on the timing of expression (37), we investigated whether this hypothesis could account for the observed variability. This was not the case. Based on microarray data (33), PfA680, PfE60, and PfD80 have the same pattern of transcription, but their topologies differ, while PfJ323, with the same topology as PfA680 and PfE60, has a different pattern of expression.

The pathway addressing parasite proteins to the Maurer's clefts has not been characterized nor have the amino acid sequences signaling them to this machinery been identified. However, recent studies identified a conserved motif in parasite proteins trafficking outside the parasite (38, 39). This VTS or Pexel motif is present in the sequence of the seven Maurer's clefts proteins newly identified in this study (Table III) and in PfPDI but not in the PfSBP1 sequence. Moreover some of the known Maurer's cleft membrane proteins like PfSBP1 have no signal peptide, while others including members of a recently identified family of putative Maurer's cleft proteins do (3, 40). Interestingly Sam-Yellowe and colleagues (40) defined PfA680 as belonging to this family. Here we established its location in the Maurer's clefts. Members of this family have two predicted transmembrane domains close to their carboxyl terminus and separated by a three to nine-residue loop. Although not members of this family, PfE60 and PfJ23, unambiguously located in Maurer's clefts, display the same characteristic. However, if this property participates in the targeting of proteins to the Maurer's clefts, it is again not a ubiquitous feature of Maurer's cleft transmembrane proteins as illustrated by PfSBP1.

Taken together, our results strongly support that several pathways based on various signal motifs are addressing parasite proteins to the Maurer's clefts. As proposed by Cooke and colleagues (29), a distinctive class of double membrane vesicles exported from the parasite endoplasmic reticulum to the parasitophorous vacuole membrane may participate in the relocation of some parasite proteins to the erythrocyte cytoplasm.

A Study Shedding New Light on the Biological Roles of Maurer's Clefts—Some of the proteins that we detected in the ghost preparations were not precisely located but have a predicted function consistent with their localization in a secretory compartment. These include several chaperones (five heat shock proteins), endoplasmin, and PfPDI, involved in protein folding. Endoplasmin and PfPDI are located in the endoplasmic reticulum in mammalian cells, but confocal microscopy studies suggest that PfPDI is also partly exported to the Maurer's clefts.[4] This is consistent with our study in which PfPDI was detected by Western blotting and protected from proteinase K digestion in ghost preparations. Taken together, our results support that Maurer's clefts are a secretory compartment transposed in the cytoplasm of the parasite host cell.

Proteins of known function were also identified in ghost preparations that may suggest that the Maurer's clefts are not only involved in protein trafficking. One such protein, hypoxanthine phosphoribosyltransferase, is involved in purine metabolism and has been located in vesicle-like structures within the cytoplasm of infected erythrocytes (41). Phosphoethanolamine *N*-methyltransferase is required for phosphatidylcholine synthesis (42) and may participate in the extensive synthesis of membrane as the parasite develops inside its host cell. The 14-3-3 protein is evolutionarily conserved and has been described as a serine/threonine-binding protein involved in signal transduction events (43). In addition, two small GTP-binding proteins from the Ran and Rack signal transduction families were identified. Although their location within Maurer's clefts requires further investigation, signal transduction events controlling the biological function of Maurer's clefts have been suggested by the presence of the PfPP1 phosphatase in the lumen of this compartment and its central role for merozoite release.[2]

Our study also identified two rhoptry-associated proteins, RhopH2 and PfE75, a protein similar to RAP2 encoded by gene PFE0075c. These findings are consistent with results from Sam-Yellowe and colleagues (44) showing that RhopH3, a rhoptry-associated protein and member of the rhoptry high molecular weight complex including three proteins (RhopH1–3), might transit through Maurer's cleft-like vesicles in early parasite stages when the rhoptries have not formed.

[4] P. Grellier, personal communication.

Interestingly the product of adjacent genes on chromosome 5, PFE0050w, PFE0055c, PFE0060w, PFE0065w (encoding PfSBP1), and PFE0075c were all identified by MS analyses of infected erythrocyte ghosts. Among them, PfSBP1 and PFE60 are transmembrane proteins of the Maurer's clefts. Whether the proteins encoded by this cluster of genes are all located in the Maurer's clefts is currently being investigated. PFE0055c is annotated as encoding a putative chaperone protein, and PfE75 is annotated as a rhoptry-associated protein. PFE0070w encodes the PfE70 protein with basic amino acid repeats similar to those of PfSBP1 that have been shown to mediate an interaction with the erythrocyte protein LANCL1 (lantibiotic synthetase component c-like protein).[5] This interaction has been proposed to participate in the binding of the Maurer's clefts to the red cell membrane in late parasite stages. Because Maurer's clefts are linked to the red cell membrane throughout the intraerythrocytic parasite development, other interactions have to be involved. Whether PfE70 is mediating such an interaction is currently being investigated.

In conclusion, our study was validated by the identification of seven new Maurer's cleft proteins and sheds new light on the important biological functions of this parasite-derived compartment. Our results confirmed that Maurer's clefts have characteristics of a secretory compartment addressing parasite proteins to the red cell surface. They also support the hypothesis that rhoptry proteins may transit through the Maurer's clefts and suggest the occurrence of signal transduction events and the presence of enzymes. Some of these proteins may be essential for the parasite development, and because they are likely parasite-specific, they could constitute new attractive drug targets.

Acknowledgments—We are grateful to H. Vial for support. We thank M. Guillotte for help in animal handling, P. Grellier for the anti-PfPDI antibody, K. Lingelbach and J. Nyalwidhe for sharing unpublished data, and S. Ralph for critical reading of the manuscript. The Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique thanks Bruker Daltonics for technical support.

* This work was supported by the Pasteur Institute, the CNRS, and the "Programme de Recherche Fondamentale en Microbiologie et Maladies Infectieuses et Parasitaires" from the Ministère Français de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie. Bruker Daltonics also provided financial support. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "*advertisement*" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[S] The on-line version of this article (available at http://www.mcponline.org) contains supplemental material.

§ Supported by fellowships from the Ministère Français de l'Éducation Nationale de la Recherche et de la Technologie and from the Fonds Inkerman de la Fondation de France.

‖ Supported by a fellowship from the Ministère Français de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie and the Internationales Graduiertenkolleg/International Research Training Group 532.

§§ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-4-67-14-33-81; Fax: 33-4-67-14-42-86; E-mail: cbb@univ-montp2.fr.

[5] T. Blisnick, L. Vincensini, J. C. Barale, A. Namane, and C. Braun Breton, submitted for publication.

REFERENCES

1. Deitsch, K. W. & Wellems, T. E. (1996) Membrane modifications in erythrocytes parasitized by *Plasmodium falciparum. Mol. Biochem. Parasitol.* **76,** 1–10
2. Langreth, S. G., Jensen, J. B., Reese, R. T. & Trager, W. (1978) Fine structure of human malaria in vitro. *J. Protozool.* **25,** 443–452
3. Blisnick, T., Morales Betoulle, M. E., Barale, J. C., Uzureau, P., Berry, L., Desroses, S., Fujioka, H., Mattei, D. & Braun Breton, C. (2000) Pfsbp1, a Maurer's cleft *Plasmodium falciparum* protein, is associated with the erythrocyte skeleton. *Mol. Biochem. Parasitol.* **111,** 107–121
4. Hinterberg, K., Scherf, A., Gysin, J., Toyoshima, T., Aikawa, M., Mazie, J. C., da Silva, L. P. & Mattei, D. (1994) *Plasmodium falciparum*: the Pf332 antigen is secreted from the parasite by a brefeldin A-dependent pathway and is translocated to the erythrocyte membrane via the Maurer's clefts. *Exp. Parasitol.* **79,** 279–291
5. Adisa, A., Albano, F. R., Reeder, J., Foley, M. & Tilley, L. (2001) Evidence for a role for a *Plasmodium falciparum* homologue of Sec31p in the export of proteins to the surface of malaria parasite-infected erythrocytes. *J. Cell Sci.* **114,** 3377–3386
6. Hayashi, M., Taniguchi, S., Ishizuka, Y., Kim, H. S., Wataya, Y., Yamamoto, A. & Moriyama, Y. (2001) A homologue of *N*-ethylmaleimide-sensitive factor in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* is exported and localized in vesicular structures in the cytoplasm of infected erythrocytes in the brefeldin A-sensitive pathway. *J. Biol. Chem.* **276,** 15249–15255
7. Wickham, M. E., Rug, M., Ralph, S. A., Klonis, N., McFadden, G. I., Tilley, L. & Cowman, A. F. (2001) Trafficking and assembly of the cytoadherence complex in *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes. *EMBO J.* **20,** 5636–5649
8. Haldar, K., Mohandas, N., Samuel, B. U., Harrison, T., Hiller, N. L., Akompong, T. & Cheresh, P. (2002) Protein and lipid trafficking induced in erythrocytes infected by malaria parasites. *Cell. Microbiol.* **4,** 383–395
9. Braun-Breton, C., Jendoubi, M., Brunet, E., Perrin, L., Scaife, J. & Pereira da Silva, L. (1986) *In vivo* time course of synthesis and processing of major schizont membrane polypeptides in *Plasmodium falciparum. Mol. Biochem. Parasitol.* **20,** 33–43
10. Chevallet, M., Wagner, E., Luche, S., van Dorsselaer, A., Leize-Wagner, E. & Rabilloud, T. (2003) Regeneration of peroxiredoxins during recovery after oxidative stress: only some overoxidized peroxiredoxins can be reduced during recovery after oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **278,** 37146–37153
11. Pasvol, G., Wilson, R. J., Smalley, M. E. & Brown, J. (1978) Separation of viable schizont-infected red cells of *Plasmodium falciparum* from human blood. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **72,** 87–88
12. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227,** 680–685
13. Perkins, D. N., Pappin, D. J., Creasy, D. M. & Cottrell, J. S. (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **20,** 3551–3567
14. Smith, D. B. & Johnson, K. S. (1988) Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione *S*-transferase. *Gene* (*Amst.*) **67,** 31–40
15. Frangioni, J. V. & Neel, B. G. (1993) Solubilization and purification of enzymatically active glutathione *S*-transferase (pGEX) fusion proteins. *Anal. Biochem.* **210,** 179–187
16. Le Roch, K. G., Zhou, Y., Blair, P. L., Grainger, M., Moch, J. K., Haynes, J. D., De La Vega, P., Holder, A. A., Batalov, S., Carucci, D. J. & Winzeler, E. A. (2003) Discovery of gene function by expression profiling of the malaria parasite life cycle. *Science* **301,** 1503–1508
17. Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. & von Heijne, G. (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* **10,** 1–6
18. Roth, E. F., Jr., Calvin, M. C., Max-Audit, I., Rosa, J. & Rosa, R. (1988) The enzymes of the glycolytic pathway in erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum* malaria parasites. *Blood* **72,** 1922–1925
19. Sirover, M. A. (1999) New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Bio-*

chim. Biophys. Acta **1432,** 159–184
20. Daubenberger, C. A., Tisdale, E. J., Curcic, M., Diaz, D., Silvie, O., Mazier, D., Eling, W., Bohrmann, B., Matile, H. & Pluschke, G. (2003) The N′-terminal domain of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of the apicomplexan *Plasmodium falciparum* mediates GTPase Rab2-dependent recruitment to membranes. *Biol. Chem.* **384,** 1227–1237
21. Kriek, N., Tilley, L., Horrocks, P., Pinches, R., Elford, B. C., Ferguson, D. J., Lingelbach, K. & Newbold, C. I. (2003) Characterization of the pathway for transport of the cytoadherence-mediating protein, PfEMP1, to the host cell surface in malaria parasite-infected erythrocytes. *Mol. Microbiol.* **50,** 1215–1227
22. Waterkeyn, J. G., Wickham, M. E., Davern, K. M., Cooke, B. M., Coppel, R. L., Reeder, J. C., Culvenor, J. G., Waller, R. F. & Cowman, A. F. (2000) Targeted mutagenesis of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 3 (PfEMP3) disrupts cytoadherence of malaria-infected red blood cells. *EMBO J.* **19,** 2813–2823
23. Birago, C., Albanesi, V., Silvestrini, F., Picci, L., Pizzi, E., Alano, P., Pace, T. & Ponzi, M. (2003) A gene-family encoding small exported proteins is conserved across *Plasmodium* genus. *Mol. Biochem. Parasitol.* **126,** 209–218
24. Kaviratne, M., Khan, S. M., Jarra, W. & Preiser, P. R. (2002) Small variant STEVOR antigen is uniquely located within Maurer's clefts in *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *Eukaryot. Cell* **1,** 926–935
25. Miller, S. K., Good, R. T., Drew, D. R., Delorenzi, M., Sanders, P. R., Hodder, A. N., Speed, T. P., Cowman, A. F., de Koning-Ward, T. F. & Crabb, B. S. (2002) A subset of *Plasmodium falciparum* SERA genes are expressed and appear to play an important role in the erythrocytic cycle. *J. Biol. Chem.* **277,** 47524–47532
26. Weber, J. L., Lyon, J. A., Wolff, R. H., Hall, T., Lowell, G. H. & Chulay, J. D. (1988) Primary structure of a *Plasmodium falciparum* malaria antigen located at the merozoite surface and within the parasitophorous vacuole. *J. Biol. Chem.* **263,** 11421–11425
27. Johnson, D., Gunther, K., Ansorge, I., Benting, J., Kent, A., Bannister, L., Ridley, R. & Lingelbach, K. (1994) Characterization of membrane proteins exported from *Plasmodium falciparum* into the host erythrocyte. *Parasitology* **109,** 1–9
28. Przyborski, J. M., Wickert, H., Krohne, G. & Lanzer, M. (2003) Maurer's clefts—a novel secretory organelle? *Mol. Biochem. Parasitol.* **132,** 17–26
29. Cooke, B. M., Lingelbach, K., Bannister, L. H. & Tilley, L. (2004) Protein trafficking in *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *Trends Parasitol.* **20,** 581–589
30. Taraschi, T. F., O'Donnell, M., Martinez, S., Schneider, T., Trelka, D., Fowler, V. M., Tilley, L. & Moriyama, Y. (2003) Generation of an erythrocyte vesicle transport system by *Plasmodium falciparum* malaria parasites. *Blood* **102,** 3420–3426
31. Wickert, H., Wissing, F., Andrews, K. T., Stich, A., Krohne, G. & Lanzer, M. (2003) Evidence for trafficking of PfEMP1 to the surface of *P. falciparum*-infected erythrocytes via a complex membrane network. *Eur. J. Cell Biol.* **82,** 271–284
32. Gunther, K., Tummler, M., Arnold, H. H., Ridley, R., Goman, M., Scaife, J. G. & Lingelbach, K. (1991) An exported protein of *Plasmodium falciparum* is synthesized as an integral membrane protein. *Mol. Biochem. Parasitol.* **46,** 149–157
33. Bozdech, Z., Llinas, M., Pulliam, B. L., Wong, E. D., Zhu, J. & DeRisi, J. L. (2003) The Transcriptome of the Intraerythrocytic Developmental Cycle of *Plasmodium falciparum. PLoS Biol.* 1–17, E5
34. Florens, L., Liu, X., Wang, Y., Yang, S., Schwartz, O., Peglar, M., Carucci, D. J., Yates, J. R., III & Wub, Y. (2004) Proteomics approach reveals novel proteins on the surface of malaria-infected erythrocytes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **135,** 1–11
35. Nyalwidhe, J., Baumeister, S., Hibbs, A. R., Tawill, S., Papakrivos, J., Volker, U. & Lingelbach, K. (2002) A nonpermeant biotin derivative gains access to the parasitophorous vacuole in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes permeabilized with streptolysin O. *J. Biol. Chem.* **277,** 40005–40011
36. Fandeur, T., Le Scanf, C., Bonnemains, B., Slomianny, C. & Mercereau-Puijalon, O. (1995) Immune pressure selects for *Plasmodium falciparum* parasites presenting distinct red blood cell surface antigens and inducing strain-specific protection in Saimiri sciureus monkeys. *J. Exp. Med.* **181,** 283–295
37. Rug, M., Wickham, M. E., Foley, M., Cowman, A. F. & Tilley, L. (2004) Correct promoter control is needed for trafficking of the ring-infected erythrocyte surface antigen to the host cytosol in transfected malaria parasites. *Infect Immun.* **72,** 6095–6105
38. Hiller, N. L., Bhattacharjee, S., van Ooij, C., Liolios, K., Harrison, T., Lopez-Estrano, C. & Haldar, K. (2004) A host-targeting signal in virulence proteins reveals a secretome in malarial infection. *Science* **306,** 1934–1937
39. Marti, M., Good, R. T., Rug, M., Knuepfer, E. & Cowman, A. F. (2004) Targeting malaria virulence and remodeling proteins to the host erythrocyte. *Science* **306,** 1930–1933
40. Sam-Yellowe, T. Y., Florens, L., Johnson, J. R., Wang, T., Drazba, J. A., Le Roch, K. G., Zhou, Y., Batalov, S., Carucci, D. J., Winzeler, E. A. & Yates, J. R., III (2004) A *Plasmodium* gene family encoding Maurer's cleft membrane proteins: structural properties and expression profiling. *Genome Res.* **14,** 1052–1059
41. Shahabuddin, M., Gunther, K., Lingelbach, K., Aikawa, M., Schreiber, M., Ridley, R. G. & Scaife, J. G. (1992) Localisation of hypoxanthine phosphoribosyl transferase in the malaria parasite *Plasmodium falciparum. Exp. Parasitol.* **74,** 11–19
42. Pessi, G., Kociubinski, G. & Mamoun, C. B. (2004) A pathway for phosphatidylcholine biosynthesis in *Plasmodium falciparum* involving phosphoethanolamine methylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101,** 6206–6211
43. van Hemert, M. J., Steensma, H. Y. & van Heusden, G. P. (2001) 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis. *Bioessays* **23,** 936–946
44. Sam-Yellowe, T. Y., Fujioka, H., Aikawa, M., Hall, T. & Drazba, J. A. (2001) A *Plasmodium falciparum* protein located in Maurer's clefts underneath knobs and protein localization in association with Rhop-3 and SERA in the intracellular network of infected erythrocytes. *Parasitol. Res.* **87,** 173–185

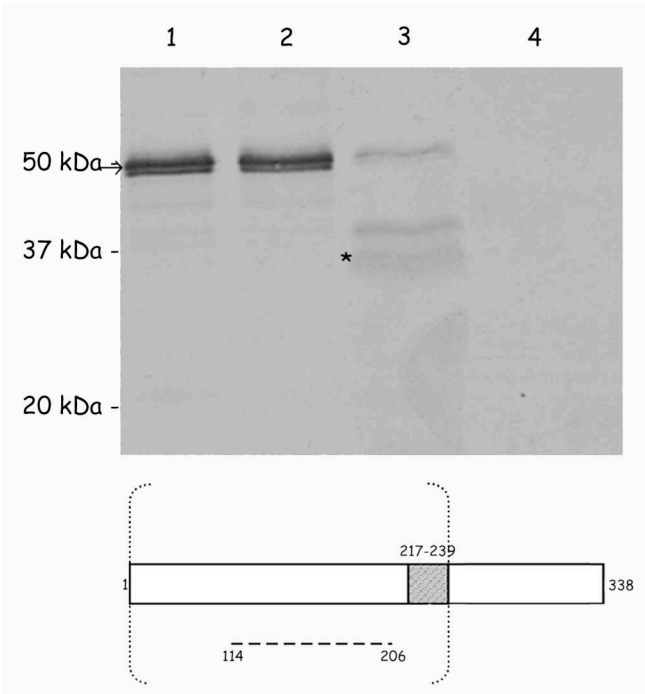
Supplementary data

Locus	Protein description	predicted				No peptides	% Coverage
		SP	TMD	MM (kDa)	pHi		
PFC0400w	60S acidic ribosomal prot P2	0	0	11,9	4,37	1	21%
PFC0295c	40S ribosomal prot S12	0	0	15,4	4,87	4	41%
PF08_0076	40S ribosomal subunit prot S16	0	0	16,3	10,94	5	36%
MAL13P1.92	40S ribosomal prot S15	0	0	17	10,96	2	20%
PFC0775w	40S ribosomal prot S11	0	0	18,7	10,92	3	30%
PF14_0296	ribosomal protein L14	0	1	19,3	11,09	3	29%
PFD1055w	ribosomal protein S19	0	0	19,7	10,79	6	58%
PF07_0079	60S ribosomal prot L11a	0	0	20,2	10,74	4	32%
PF13_0224	60S ribosomal prot L18	0	0	21,7	11,03	5	46%
PF07_0088	40S ribosomal prot S5	0	0	21,8	9,71	3	15%
PFE1005w	40S ribosomal prot S9	0	0	22,1	10,98	5	36%
PF13_0014	40S ribosomal prot S7	0	0	22,5	10,62	5	38%
PF10_0043	ribosomal protein L13	0	0	23,7	10,81	5	38%
PF14_0627	ribosomal prot S3	0	0	24,7	10,7	9	54%
PF14_0391	Ribosomal prot L1	0	0	24,8	10,82	4	49%
PF14_0083	ribosomal prot S8e	0	0	25	10,78	4	28%
PF14_0141	ribosomal prot L10	0	0	25,2	10,39	4	46%
PF13_0213	60S ribosomal protein L6e	0	0	25,5	11,07	6	56%
PFE0845c	60S ribosomal prot L8	0	0	28	11,12	3	12%
PF10_0264	40S ribosomal prot	0	0	29,8	5,92	4	36%
PFC1020c	40S ribosomal prot S3A	0	0	30	10,71	12	54%
PF14_0231	Ribosomal protein L7a	0	0	32,6	11,19	5	45%
PF14_0230	ribosomal prot L5	0	0	34	10,36	5	44%
PF11_0313	ribosomal phosphoprotein P0	0	0	34,9	6,57	7	49%
PF13_0228	40S ribosomal prot S6	0	0	35,4	11,3	4	28%
MAL7P1.81	Eukaryotic translation initiation factor 3	0	0	37,3	6,83	2	15%
PF13_0304	elongation factor 1 alpha	0	0	48,9	9,76	2	8%

Supplementary table 1 : Ribosomal proteins and proteins of the translation machinery identified from *P. falciparum* infected red blood cell ghosts by tandem mass spectroscopy

Supplementary table 1: Ribosomal proteins and proteins of the translation machinery identified from P. falciparum infected red blood cell ghosts by tandem mass spectroscopy. The peptides were assigned by Mascot analysis. The gene locus as annotated in the

Plasmodium data base (PDB; http://www.plasmodb.org) is indicated for each identified protein. The protein names or putative function (protein description) their predicted molecular mass (MM) and calculated pHi as determined using DNAStrider™ 1.3 (CEA, Saclay, France) are indicated. The final two columns give the number of peptides identified in the mass spectrum and the percentage of coverage of the total protein sequence of those peptides.



Supplementary figure 1: Topology analysis of PfSBP1 within infected erythrocyte ghost preparations.

Supplementary figure 1: Topology analysis of PfSBP1 within infected erythrocyte ghost preparations. Ghosts were prepared from Plasmion -enriched trophozoites and schizonts and incubated in RPMI (lanes 1) or RPMI supplemented with 0,5% Triton X-100 (lanes 2), 5 mg ml^{-1} proteinase K (lanes 3), 0,5% Triton X-100 and 5 mg ml^{-1} proteinase K (lanes 4). The digest products were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting using a mouse serum raised against the BR5 aminoterminal domain of PfSBP1 (3) (underlined by dotted lines). Molecular mass markers are indicated (kDa). A schematic drawing of the protein sequence is presented with the trans-membrane domain (hatched box). The protein region protected from proteinase K digestion is indicated in brackets. The full-length PfSBP1 protein (arrowed) and

its proteinase K degradation product (asterisk) are detected as a doublet resulting from post-translational modifications of the protein within the aminoterminal domain[1].

[1]- Blisnick, T., Vincensini L., Fall, G., and Braun Breton, C. PP1 phosphatase, a *Plasmodium falciparum* essential enzyme, is exported to the host cell and implicated in the release of infectious merozoites. Submitted.

Discussion de l'article 4

L'analyse protéomique que nous avons réalisée vise à caractériser spécifiquement les structures de Maurer ; pour ce faire, nous avons utilisé des préparations de fantômes érythrocytaires, qui constituent pour l'instant le matériel biologique disponible le plus adapté à l'étude de ce compartiment. Elles contiennent la membrane plasmique érythrocytaire, le squelette sous-membranaire du globule rouge, et au moins une partie des structures de Maurer, qui restent associées à la membrane érythrocytaire lors de la lyse cellulaire. Il ne s'agit donc pas préparations de structures de Maurer purifiées, et l'identification de protéines au sein d'un tel échantillon doit faire l'objet d'une étape supplémentaire, afin d'établir si elles sont spécifiquement associées aux structures de Maurer. Afin de permettre de distinguer en spectrométrie de masse les protéines parasitaires des protéines érythrocytaires, les fantômes de globules rouges parasités ont été préparés à partir d'une culture de *P. falciparum* métaboliquement marquée avec de la lysine deutérée. De fait, les analyses de spectrométrie de masse ont identifié des peptides existant sous la forme de doublets, dont la masse diffère de 4 Da, et dont le rapport d'intensité est proche de 1 (figure 1 de l'article). Ceci confirme que parmi les résidus lysine incorporés pendant la durée du marquage, seul un sur deux est deutéré. Les étapes suivantes d'identification des protéines ont été restreintes à ces peptides, et ont exclusivement identifié des protéines parasitaires. Ce résultat confirme que l'approche utilisée permet effectivement de faire la distinction entre les protéines parasitaires et érythrocytaires.

1- Identification de protéines parasitaires marquées à la lysine deutérée

Soixante dix-huit protéines parasitaires ont été identifiées à partir des 67 bandes découpées dans le gel. Les 28 protéines ribosomales et les cinq enzymes glycolytiques ont d'emblée été considérées comme des contaminations : ces composés cytosoliques très abondants (surtout les protéines ribosomales) sont en effet couramment identifiés lors d'analyses protéomiques globales. Mais la détection de ces protéines cytoplasmiques très abondantes suggère néanmoins qu'une fraction des globules rouges parasités est totalement lysée lors de la préparation des fantômes. Les cinquante autres protéines ont des caractéristiques générales

très variées : des protéines de toutes les configurations sont observées, avec et sans peptide signal prédit, avec et sans domaine transmembranaire putatif (voir table 1 de l'article et tableau 4). Ce constat est le premier élément qui soulève la question des voies d'export vers le cytoplasme du globule rouge, sur laquelle nous reviendrons par la suite. Le Pexel, signal d'export hors de la vacuole parasitophore, a été caractérisé peu avant la publication de nos travaux (Marti, Good *et al.* 2004), et il est intéressant de rechercher parmi ces protéines lesquelles contiennent un motif Pexel : d'après les alignements publiés par Marti et collègues, seules 12 des protéines que nous avons identifiées dans les préparations de fantômes érythrocytaires ont un Pexel. Néanmoins, l'annotation manuelle des protéines de la liste révèle que 32 des 50 protéines que nous avons identifiées possédent en réalité un motif Pexel : leur séquence et leur localisation sont indiquées dans le tableau 4. Certains d'entre eux sont atypiques, mais nous pensons qu'ils s'apparentent suffisamment à la séquence consensus pour être signalés. Le rôle exact du Pexel dans l'export des protéines hors du parasite est encore méconnu, mais il apparaît déjà que certaines protéines dépourvues de Pexel, dont PfSBP1 et PfExp1, sont exportées. A l'inverse, on ignore à ce jour si toutes les protéines possédant un Pexel sont effectivement exportées. La présence ou l'absence de motif Pexel doit donc être interprétée avec prudence…

Locus	Nom de la protéine	prédiction		
		SS	TM	Pexel
CLASSE A				
PF11_0183	GTP binding prot ran/tc4	0	0	-
PF10_0121	hypoxanhine phosphoribosyl transferase	0	0	-
PF10_0086	adenylate kinase	0	0	-
PF14_0378	triose phosphate isomerase	0	0	K_{21}SLTN (atypique)
MAL8P1.69	14.3.3 protein	0	0	R_{35}TLVE
MAL13P1.214	phosphoethanolamine N methyl transferase	0	0	K_{46}ILSD
PF08_0019	GTP binding prot rack	0	0	-
PF14_0598	glyceraldehyde 3 P dehydrogenase	0	0	-
PF14_0425	fructose bisphosphate aldolase	0	0	-
PF14_0434	hypothetical protein	0	0	K_{31}DLNE
PF11_0351	heat shock protein, 70 kDa, homologue	0	0	K_{11}ILER (atypique)
PF08_0054	heat shock protein, 70 kDa	0	0	-
CLASSE B				
PFE0760w	hypothetical protein	0	1	R_{60}LIGD
PFE0660c	purine nucleoside phosphorylase	0	1	R_{6}HLKI
PFD1170c	RESA like prot	0	1	R_{86}ILSE
PFE0065w	**PfSBP1**	**0**	**1**	**-**
PFL0780w	glycerol 3 P dehydrogenase,	0	1	R_{2}NLFD
PF10_0155	enolase	0	1	R_{11}EILD
MAL6P1.160	pyruvate kinase	0	1	R_{24}QILE
PFE1600w	hypothetical protein	0	1	R_{88}NLCE
PF07_0029	PfHsp86	0	1	K_{27}EIFL (atypique)
PF10_0023	**hypothetical protein (PfJ23)**	**0**	**3**	**R_{87}FLSE**
PF10_0366	ADP/ATP transporter on adenylate translocase	0	3	-
CLASSE C				
PF10_0013	**hypothetical protein (PfJ13)**	**1**	**0**	**R_{47}LISE**
PFE0050w	hypothetical protein	1	0	R_{89}VLAE
PF14_0678	Exp 2	1	0	-
PF13_0141	L lactate dehydrogenase	1	0	K_{26}NLGD (atypique)
MAL7P1.174	**hypothetical protein (PfG174)**	**1**	**0**	**R_{52}ILSE**
PF13_0197	merozoite surface protein 7	1	0	K_{50}NIVS (atypique)
PFE0075c	rhoptry associated protein	1	0	K_{27}ALID (atypique)
PFE0055c	heat shock protein	1	0	R_{60}SLAE
PF11_0055	hypothetical protein	1	0	-
MAL8P1.17	**disulfide isomerase precursor**	**1**	**0**	**R_{65}LIPE**
PFB0100c	KHRP1	1	0	R_{54}TLAQ
PFI0875w	heat shock protein	1	0	-
PFL0050c	hypothetical protein	1	0	R_{46}ILSS
PFL1385c	ABRA	1	0	-
PF10_0159	GBP 130 precursor	1	0	R_{84}ILAE
PFB0335c	SERA	1	0	-
PFB0340c	SERA	1	0	-
CLASSE D				
PFD0310w	sexual stage specific protein precursor	1	1	K_{5}FIPS (atypique)
PF11_0224	Exp 1	1	1	-
PF10_0323°	**hypothetical protein (PfJ323)**	**1**	**1**	**R_{52}NLIL****
PFL1070c	endoplasmin homologue precursor	1	1	R_{25}VLCD
PFI1445w	RHOPH2	1	1	-
PFI1475w	MSP-1	1	1 /GPI	-
PFA0680c	**hypothetical protein (PfA680)**	**1***	**2**	**R_{43}MLAQ**
PFE0060w	**hypothetical protein (PfE60)**	**1**	**2**	**R_{43}TLAD**
PFD0080c	**hypothetical protein (PfD80)**	**1**	**3, 4**	**R_{46}NLSE**
PF14_0541	V type H+ translocating pyrophosphatase	1	15	K_{52}EIAS (atypique)

Tableau 4 : Protéines identifiées par spectrométrie de masse au sein des préparations de fantômes de globules rouges parasités.

Les séquences signal et domaines transmembranaires, ainsi que les motifs Pexel prédits sont indiqués.

° : annoté en tant que chr10.gen_151 ; *: réannoté par Sam-Yellowe et collègues (Sam-Yellowe, Florens *et al*. 2004) ; ** : ce motif Pexel n'est pas celui que nous indiquons dans l'article.

Nous avons identifié au sein des préparations de fantômes de globules rouges parasités un certain nombre de protéines qui ont été précédemment décrites comme étant associées aux préparations de fantômes érythrocytaires, ainsi que des protéines de la vacuole parasitophore. Les protéines PfSBP1 et HRPI ont été précédemment décrites comme étant associées aux fantômes de globules rouges parasités, et leur localisation au niveau des structures de Maurer et/ou de la membrane érythrocytaire est bien documentée (Wickham, Culvenor *et al.* 2003). D'autres protéines sont moins bien caractérisées, telle PfE60, dont une étude récente a montré qu'elle est insérée dans la membrane érythrocytaire, et pourrait également être recrutée à la surface des structures de Maurer (Florens, Liu *et al.* 2004), et PfA680, qui a été identifiée par immunoprécipitation avec un anticorps monoclonal dirigé contre une protéine –qui n'est pas connue- localisée dans les structures de Maurer (Sam-Yellowe, Florens *et al.* 2004). L'identification de ces protéines valide les préparations de fantômes de globules rouges parasités en tant que matériel d'étude des structures de Maurer. En revanche, d'autres protéines décrites comme étant associées aux structures de Maurer n'ont pas été identifiées. Cette absence de détection pourrait être liée à la taille de ces protéines : dans la mesure où aucune protéine ayant une masse moléculaire de plus de 190 kDa et de moins de 12 kDa n'a été identifiée, il est probable que les protéines PfEMP1 (200 à 400 kDa) et PfEMP3 (273 kDa) n'ont pas pénétré dans le gel séparatif, alors que les protéines SEP-etramp (12 à 16 kDa) sont sorties du gel. Il est plus étonnant de ne pas identifier les protéines STEVOR, qui ont une masse moléculaire allant de 30 à 40 kDa, et qui sont localisées dans les structures de Maurer aux stades trophozoïte mûr et schizonte (Kaviratne, Khan *et al.* 2002). Ces protéines, très hydrophobes, pourraient former des agrégats résistants à la digestion trypsique ; alternativement, les peptides hydrophobes pourraient être perdus lors de la nanoLC-MS/MS.

L'identification de cinq protéines associées à la vacuole parasitophore n'a guère éclairé la question de la relation entre les structures de Maurer et la vacuole parasitophore. D'après nos résultats, seul un nombre restreint de protéines de la vacuole parasitophore est présent dans les fantômes érythrocytaires, d'autant plus qu'une étude décrit l'export de deux de ces protéines, PfExp1 et PfExp2, dans un compartiment membranaire au sein du cytoplasme du globule rouge (Johnson, Gunther *et al.* 1994). La comparaison de nos résultats avec ceux de l'étude protéomique globale de la vacuole parasitophore menée par Julius Nyalwidhe et Klaus Lingelbach (Université de Marburg, Allemagne) confirme cette tendance : seules 10 protéines sont communes aux deux analyses, dont deux sont des protéines glycolytiques contaminantes. Ainsi, nos travaux ne permettent pas de conclure sur la relation exacte entre la vacuole

parasitophore et les structures de Maurer, mais confirment que, dans l'hypothèse où les deux structures seraient en continuité physique, les protéines ne diffusent pas librement de l'une à l'autre.

2- Identification de protéines hypothétiques localisées dans les structures de Maurer

Notre analyse identifie 13 protéines hypothétiques spécifiées par des gènes putatifs déduits de l'annotation du génome ; elles ont toutes les configurations possibles en termes de présence de peptide signal et/ou de domaine transmembranaire (tableau 4). Parce que ces protéines n'ont pas d'homologue chez d'autres espèces, elles pourraient intervenir dans des processus biologiques spécifiques au parasite ; elles sont de plus susceptibles d'être localisées dans les structures de Maurer. Ces protéines hypothétiques apparaissent donc particulièrement intéressantes, et nous avons décidé de mieux caractériser certaines d'entre elles. Tout d'abord, nous nous sommes concentrés sur les protéines dont le pourcentage de recouvrement est supérieur à 20 % -ou 19% pour PfD80-, bien que ce paramètre ne soit qu'une estimation imparfaite de la confiance à accorder à un résultat, dans la mesure où le pourcentage de recouvrement de PfSBP1 est de 10 %. Ensuite, nous avons exclu la protéine hypothétique dépourvue de peptide signal et de domaine transmembranaire, spécifiée par le gène PF14_0434, en considérant qu'il était peu probable qu'elle soit adressée vers la voie de sécrétion. A ce moment-là, le Pexel n'était pas encore décrit : la protéine en possède un, même s'il est atypique, et nous ne ferions pas forcément le même choix aujourd'hui. Nous avons préféré cibler notre étude sur les protéines possédant un peptide signal et un domaine transmembranaire en sélectionnant tous les candidats possibles (PfJ323, PfA680, PfE60, PfD80) : de telles protéines pourraient être transmembranaires des structures de Maurer. D'autre part, parce que PfSBP1 est insérée dans la membrane des structures de Maurer alors qu'elle ne possède pas de peptide signal, nous avons sélectionné PfJ23, qui a la même organisation. Nous avons également sélectionné PfJ13 et PfG174, deux protéines possédant un peptide signal et pas de domaine transmembranaire, en supposant qu'elles pourraient être solubles dans les structures de Maurer. Il est intéressant de constater *a posteriori* que les sept protéines hypothétiques que nous avons choisies d'étudier comportent un Pexel. Nous avons exprimé un domaine hydrophile de chacune de ces sept protéines hypothétiques sous la forme de protéines recombinantes fusionnées à la GST (glutathione-*S*-transférase), que nous avons injectées à des souris, afin d'obtenir des sérums polyclonaux spécifiques. Aucun des sérums

ne réagit avec des globules rouges sains, que ce soit en immunoempreinte ou immunofluorescence. En immunoempreinte, les sérums obtenus reconnaissent des protéines ayant approximativement la taille attendue, qui sont associées spécifiquement aux globules rouges parasités (extrait total) et aux préparations de fantômes. En immunofluorescence, aucun marquage n'a été détecté avec les sérums dirigés contre PfD80, PfG174 et PfJ13 ; en revanche, le marquage lié aux sérums dirigés contre PfE60 et PfJ23 est ponctiforme et caractéristique des structures de Maurer, à la fois sur des parasites intacts et des préparations de fantômes érythrocytaires. Le marquage lié aux sérums spécifiques de PfJ323 et PfA680 est ponctiforme, mais avec une composante diffuse, ce qui suggère que la protéine est localisée pour partie dans la vacuole parasitophore, et pour partie dans les structures de Maurer. En accord avec nos résultats, une étude concomitante à nos travaux a montré que PfJ323 appartient à la famille SEP/etramp (Spielmann, Fergusen *et al.* 2003), qui a été décrite comme une famille de protéines localisées dans la vacuole parasitophore et/ou les structures de Maurer. D'autre part, parce que tous les sérums que nous avons obtenus sont réactifs en immunoempreinte, nous avons déterminé la localisation et/ou la topologie de chacune des protéines sélectionneés en procédant à des expériences de digestion par la protéinase K en présence et en l'absence de détergent. Toutes les protéines, à l'exception de PfJ323 et PfG174 ont été protégées, au moins partiellement, de la protéolyse en l'absence de détergent, ce qui nous a permis d'établir un modèle de leur topologie et de leur orientation au sein des structures de Maurer (figure 5 de l'article). Nous nous sommes basés sur trois logiciels de prédiction de domaines transmembranaires, et nous avons constaté à cette occasion à quel point les prédictions peuvent varier d'un logiciel à l'autre ; nous sommes à présent convaincus de la nécessité de comparer les résultats obtenus avec différents logiciels, afin d'évaluer la robustesse des prédictions. Nous n'avons retenu ici que les domaines transmembranaires prédits par au moins deux des trois logiciels que nous avons utilisés. La protéine PfG174, qui ne possède pas de domaine transmembranaire, est entièrement dégradée même en l'absence de détergent, ce qui suggère qu'elle est cytosolique du globule rouge, soit soluble –et constituerait alors une contamination des préparations de fantômes érythrocytaire- soit périphérique de membrane, de la membrane érythrocytaire ou de la membrane des structures de Maurer. La localisation de PfJ323, protéine qui n'est plus détectée par les anticorps dont nous disposons après addition de protéinase K en absence de détergent, a pu être déduite de sa structure (présence d'un domaine transmembranaire) et du motif observé en immunofluorescence (marquage typique des structures de Maurer) : la protéine est très

probablement transmembranaire des structures de Maurer de telle manière que le domaine reconnu par les anticorps est dans le cytosol du globule rouge.

Ainsi, en concentrant nos études sur sept protéines hypothétiques des structures de Maurer, nous avons pu caractériser cinq protéines transmembranaires (PfE60, PfD80, PfJ23, PfA680 et PfJ323) et une protéine soluble dans la lumière des structures de Maurer (PfJ13). Ces protéines hypothétiques n'ont pas d'homologie avec des protéines connues, et nous ne pouvons pas formuler d'hypothèse quant à leur fonction. Néanmoins, la protéine PfE60 possède des répétitions d'acides aminés basiques très semblables à celles de PfSBP1, dont nous avons montré au chapitre 1 qu'elles sont responsables de l'interaction de PfSBP1 avec LANCL1. L'étude des interactions protéiques établies par PfE60 mettant en jeu ces domaines basiques s'annonce d'ores et déjà très intéressante : à l'inverse de PfSBP1, les répétitions de PfE60 sont localisées dans la lumière des structures de Maurer, ce qui suggère que leur rôle biologique est différent. Elles pourraient par exemple intervenir dans la formation de complexes protéiques au sein des structures de Maurer ou la transduction de signaux.

3- Adressage des protéines aux structures de Maurer

La topologie de chacune des protéines sélectionnées est schématisée dans la figure 5 de l'article, et l'observation de topologies variées soulève la question de la voie de transport utilisée par chacune d'elles. En effet, toutes ces protéines, à l'exception de PfSBP1, possèdent un motif Pexel, ce qui suggère *a priori* une voie de transport commune, du moins pour le franchissement de la membrane de la vacuole parasitophore. Et, de fait, les protéines PfJ323, PfA680 et PfE60, qui possèdent un peptide signal, ont la même topologie : leur domaine amino-terminal est orienté vers la lumière des structures de Maurer. Il est alors tentant de proposer qu'elles empruntent toutes la même voie d'adressage, que pourrait également emprunter PfJ23, si l'on assimile son premier domaine transmembranaire à un peptide signal qui ne serait pas clivé. Mais le domaine amino-terminal de PfSBP1, qui ne possède pas de peptide signal, est aussi localisé dans la lumière des structures de Maurer ; le transport de cette protéine semble donc dépendre d'un autre mécanisme, probablement lié à l'absence de motif Pexel. Il est possible que les protéines dépourvues de Pexel soient transportées au sein du parasite dans des vésicules à double membrane (Cooke, Lingelbach *et al.* 2004), qui fusionnent ensuite avec la membrane de la vacuole parasitophore, ce qui modifierait leur insertion dans une membrane. La protéine PfD80 semble avoir une topologie différente, mais

le nombre élevé de domaines transmembranaires (quatre, plus un peptide signal) complique la reconstitution du mécanisme d'insertion membranaire. Ainsi, contrairement à ce que nous avons considéré dans la discussion de l'article, si l'on exclut de l'étude le cas complexe de PfD80, la topologie des protéines PfSBP1, PfJ23, PfJ323, PfE60 et PfA680 s'explique uniquement par la présence ou non d'un motif Pexel : toutes les protéines possédant un Pexel semblent avoir la même topologie (en tenant compte du clivage éventuel du peptide signal).

De façon tout à fait intéressante, la protéine PfA680 appartient à la famille PfMC-2TM, dont nous avons parlé en introduction : cette protéine a été identifiée par coimmunoprécipitation avec un anticorps dirigé contre une protéine des structures de Maurer qui n'est pas caractérisée (Sam-Yellowe, Florens *et al*. 2004). Nos travaux confirment donc la localisation d'un membre de cette famille dans les structures de Maurer. Nous avons été surpris de constater que les protéines PfE60 et PfJ23 possèdent également les deux domaines transmembranaires carboxyterminaux caractéristiques de la famille PfMC-2TM, alors qu'elles n'appartiennent pas à cette famille. Ainsi, la localisation de ces protéines au sein des structures de Maurer suggère que les deux domaines transmembranaires carboxyterminaux très rapprochés pourraient participer à l'adressage des protéines aux structures de Maurer. Le criblage des banques de données des protéines plasmodiales à la recherche de protéines possédant de tels domaines transmembranaires semble donc être une approche intéressante pour identifier des protéines putatives des structures de Maurer. Néanmoins, ces domaines ne constituent pas une caractéristique générale des protéines de structures de Maurer, ce qui suggère à nouveau une certaine diversité parmi les voies de transport vers ce compartiment.

Par ailleurs, notre étude identifie les produits de gènes contigus sur le chromosome 5 : PfE0050w, PfE0055c, PfE0060w, PfE0065w et PfE0075c, spécifiant respectivement les protéines PfE50, PfE55, PfE60, PfSBP1 et PfE75. Toutes ces protéines, à l'exception de PfSBP1, possèdent un Pexel. Parmi elles, PfSBP1 et PfE60 sont localisées dans les structures de Maurer, et il est tentant de proposer que ces gènes contigus spécifient des protéines adressées aux structures de Maurer. Nous sommes donc en train d'étudier la localisation des autres protéines spécifiées par ce groupe de gènes : parmi celles-ci, PfE55 semble être une protéine de choc thermique, et PfE75 une protéine homologue à RAP2. Il pourrait ainsi exister un phénomène de colinéarité de gènes spécifiant des protéines destinées à la même voie d'adressage et/ou au même compartiment cellulaire. Si c'était le cas, l'adressage de ces protéines ne dépendrait pas du moment auquel les protéines sont synthétisées, dans la mesure où les données du transcriptome de *P. falciparum* suggèrent que les gènes que nous étudions

ne sont pas co-exprimés (Bozdech, Llinas *et al.* 2003; Le Roch, Zhou *et al.* 2003). Par ailleurs, nous nous intéressons également au gène PfE0070w, qui spécifie la protéine hypothétique PfE70. En effet, celle-ci possède des répétitions d'acides aminés basiques similaires à celles de PfSBP1 et PfE60. Bien que notre étude n'identifie pas cette protéine au sein des préparations de fantômes, nous sommes en train d'exprimer le domaine de PfE70 possédant ces répétitions sous forme de protéine recombinante, afin d'obtenir des anticorps spécifiques permettant d'étudier sa localisation subcellulaire, et de mettre en évidence d'éventuelles interactions protéiques établies par ce domaine.

4- L'identification de certaines protéines indique que les structures de Maurer ont des fonctions biologiques variées

Un certain nombre de protéines dont la fonction est connue, mais dont on ignore la localisation subcellulaire, ont été identifiées dans les préparations de fantômes érythrocytaires. La localisation de ces protéines au sein des structures de Maurer, si elle était avérée, permettrait de préciser le rôle biologique de ce compartiment. Comme nous allons le montrer, nos résultats suggèrent que les structures de Maurer exercent des fonctions cellulaires variées, qui ne se limitent pas au transport de protéines vers la membrane érythrocytaire.

Tout d'abord, un certain nombre de protéines chaperon, caractéristiques d'un compartiment sécrétoire ont été identifiées : l'endoplasmine, cinq protéines de choc thermique, et la Protéine Disulfide Isomérase (PfPDI). Il est intéressant de constater que l'endoplasmine, PfPDI et trois des cinq protéines de choc thermique ont un Pexel (tableau 4), ce qui renforce l'hypothèse selon laquelle ces protéines seraient exportées hors du parasite. L'identification de PfPDI et de protéines de choc thermique au sein des préparations de fantômes érythrocytaires rejoint nos résultats antérieurs d'électrophorèse bidimensionnelle, et cela nous a incités à préciser leur localisation subcellulaire. Les études de microscopie confocale, réalisées par Philippe Grellier, (Museum National d'Histoire Naturelle), montrent que PfPDI est essentiellement localisée dans le RE du parasite, mais qu'une fraction est exportée dans le cytoplasme du globule rouge, où elle colocalise partiellement avec les structures de Maurer. Nos expériences confirment ce résultat : PfPDI est détectée au sein des préparation de fantômes en immunoempreinte, et elle est protégée de la digestion par la protéinase K, ce qui indique qu'elle est localisée dans des vésicules fermées associées aux fantômes de globules rouges

parasités, qui sont très probablement les structures de Maurer. En revanche, le recrutement de protéines de choc thermique au niveau des structures de Maurer est moins bien caractérisé. Les anticorps dirigés contre la protéine Pf72-HSP70, s'ils détectent en général une protéine en immunoempreinte, ne montrent pas en immunofluorescence de marquage particulier des structures de Maurer sur des préparations de fantômes. Il est donc délicat de déterminer la localisation de ces protéines, d'autant plus que Pf72-HSP70 est une protéine très abondante dans le parasite, et que les anticorps sont extrêmement sensibles : de même que pour les protéines ribosomiques, la détection, quoique faible- de Pf72-HSP70 pourrait résulter de la lyse totale d'un petit nombre de cellules lors de la lyse. Une étude de la sensibilité de Pf72-HSP70 à la protéinase K en présence et en absence de détergent permettrait de préciser si une fraction de cette protéine est exportée dans les structures de Maurer. Par ailleurs, il est connu que des protéines de choc thermique de la cellule hôte sont recrutées au niveau de structures membranaires dans le cytoplasme du globule rouge (vacuole parasitophore, structures de Maurer, ou membrane érythrocytaire), où elles pourraient participer à l'assemblage de complexes protéiques, en particulier des knobs (Banumathy, Singh *et al*. 2002). Ainsi, même si la nature exacte des protéines n'est pas encore connue, la fonction de chaperon moléculaire semble participer aux fonctions extracellulaires du parasite. D'une façon générale, ces résultats confirment que les structures de Maurer représentent un compartiment sécrétoire exporté hors du parasite dans le cytoplasme de sa cellule hôte, ayant des caractéristiques d'un appareil de Golgi.

Par ailleurs, des protéines exerçant plusieurs autres fonctions cellulaires ont été identifiées au cours de notre étude. Parmi celles-ci, l'hypoxanthine phosphoribolsyl transférase participe au métabolisme des purines, et, bien qu'elle ne possède pas de Pexel, elle est partiellement exportée dans des structures membranaires du cytoplasme du globule rouge (Shahabuddin, Gunther *et al*. 1992) ; si ces structures s'avéraient être les structures de Maurer, ce résultat constituerait la première indication du déroulement de réactions métaboliques dans ce compartiment. La phosphoéthanolamine N-méthyl transférase est impliquée dans la synthèse de la phosphatidylcholine, un composé essentiel à l'élaboration des membranes. Il est tentant de proposer, dans l'optique où cette enzyme –qui comporte un Pexel- serait bien exportée dans les structures de Maurer, que ces dernières constituent des foyers à partir desquels le réseau membranaire cytoplasmique se développe et se ramifie. Plusieurs autres protéines identifiées participent à des voies de transduction du signal : la protéine 14-3-3, et deux petites protéines G des familles *ran* et *rack*. Ce résultat rejoint les travaux que nous avons présentés au chapitre

1, qui identifient la protéine PfPP1 dans les structures de Maurer, et conforte l'hypothèse selon laquelle les structures de Maurer interviennent dans les voies de signalisation et participent à la transduction de signaux extracellulaires. Ces protéines sont dépourvues de séquence signal et de domaine transmembranaire, et les petites protéines G identifiées ne possèdent pas de motif Pexel. Leur présence au sein des structures de Maurer soulèverait alors la question du mécanisme de leur transport. En effet, à ce jour, toutes les protéines parasitaires identifiées comme étant exportées vers le cytoplasme de l'érythrocyte possèdent au moins l'un des motifs suivants : séquence signal, motif Pexel ou domaine transmembranaire. Le transport de ces protéines pourrait mettre en jeu des protéines escortes, selon le mécanisme que nous avons décrit précédemment (Baldi, Andrews *et al.* 2000; Waterkeyn, Wickham *et al.* 2000).

Nous avons également identifié deux protéines de rhoptries : RhopH2 et une protéine similaire à RAP-2. La détection de protéines de rhoptries dans cette fraction n'est pas étonnante dans la mesure où celles-ci sont sécrétées par le parasite dans la vacuole parasitophore en formation lors de son entrée dans le globule rouge. Toutefois, nous avons démontré dans le cas de RhopH2 que la protéine néosynthétisée par le parasite est, à un stade antérieur à la biogenèse des rhoptries, transportée dans les structures de Maurer ; on peut également noter la présence dans la séquence de RhopH2 d'un motif Pexel atypique fortement similaire à celui identifié pour PfEMP1 (Chapitre 2). Il est donc possible que certaines protéines de rhoptries soient exportées dans les structures de Maurer où elles pourraient exercer un rôle biologique particulier.

L'identification au sein des préparations de fantômes érythrocytaires d'un certain nombre de protéines dont la fonction est connue permet donc de formuler plusieurs hypothèses quant aux rôles biologiques des structures de Maurer. Outre le transport de protéines, les structures de Maurer pourraient participer au repliement de protéines et à l'ajout de modifications post-traductionnelles, à des synthèses métaboliques, ou encore à des processus de signalisation cellulaire. Bien entendu, l'identification de protéines au sein des fantômes ne constitue pas une preuve de leur association avec les structures de Maurer, et leur localisation doit être précisée. La démonstration de la localisation dans les structures de Maurer de six protéines sur les sept que nous avons étudiées est toutefois très encourageante et valide notre démarche. Enfin, ces résultats ouvrent des perspectives de recherche intéressantes, en indiquant certains des processus cellulaires susceptibles d'être associés aux structures de Maurer, et dont l'étude n'avait pas été envisagée jusqu'à présent.

Conclusion

L'analyse protéomique globale des préparations de fantômes de globules rouges parasités que nous avons réalisée a donc ouvert de nouvelles pistes de recherche. D'une part, l'identification d'un certain nombre de protéines dont la fonction est connue soulève la question de leur localisation subcellulaire au sein des préparations de fantômes. En effet, leur présence au sein des structures de Maurer suggèrerait que ces structures ont des fonctions biologiques insoupçonnées jusqu'à présent telles que biosynthèses et signalisation en particulier. D'autre part, la caractérisation de sept protéines hypothétiques a permis d'identifier cinq protéines transmembranaires et une protéine soluble des structures de Maurer. L'étude de leur fonction, qui passe par des études d'interactions protéiques pour PfE60 s'avère très stimulante. Certaines protéines ont des domaines essentiellement situés dans la lumière des structures de Maurer (PfA680, PfE60, PfD80 et PfJ23). Elles interagissent probablement avec les protéines des structures de Maurer, ce qui pourrait avoir plusieurs effets : retenir les protéines résidentes dans ce compartiment, ou bien contrôler la libération des protéines de façon à ce que les protéines soient amenées à la membrane érythrocytaire au moment adapté –nous pensons au cas des protéines impliquées dans la libération des mérozoïtes-, ou encore participer à l'assemblage de complexes protéiques, en particulier des knobs. La protéine transmembranaire PfJ323 se distingue par le fait que son domaine cytoplasmique carboxy-terminal, compris entre les résidus 81 et 398, est très long : elle pourrait alors établir des interactions protéiques permettant soit l'association des structures de Maurer avec la membrane érythrocytaire, soit la transduction de signaux extracellulaires, qui pourraient être impliqués dans la libération de protéines ou le contrôle de réactions de synthèse se déroulant dans ce compartiment.

L'analyse des propriétés des protéines hypothétiques étudiées soulève également la question de l'adressage aux structures de Maurer, et de l'acquisition de la topologie adéquate ; nos travaux suggèrent en effet l'existence de signaux particuliers, qui peuvent être portés par la protéine, comme la présence de deux domaines transmembranaires carboxyterminaux, ou bien portés par le gène, comme la localisation au sein d'un groupe de gènes spécifiant des protéines destinées au même compartiment subcellulaire.

D'une manière générale, le grand avantage de la méthode protéomique utilisée est d'identifier des protéines au sein de l'échantillon par une approche globale, qui n'est pas influencée par les connaissances antérieures ou par les intuitions *a priori* de l'expérimentateur, comme c'est le

cas des études qui utilisent des anticorps. De plus, l'identification d'une protéine dans un échantillon par une approche protéomique est un gage de sa présence. A l'inverse, comme nous l'avons constaté à plusieurs reprises, le fait de ne pas identifier une protéine ne signifie pas qu'elle en est absente, mais simplement qu'elle n'a pas été détectée. En ce sens, les études protéomiques sont très complémentaires des études génomiques, qui permettent de déterminer avec précision si un gène est transcrit ou non, mais si c'est le cas, ne permettent pas d'assurer que la protéine correspondante est présente. Cependant, les approches protéomiques génèrent une grande abondance de données, qui ne sont intéressantes que si elles sont replacées dans un contexte biologique précis, qui ne doit pas être perdu de vue.

Conclusion générale et perspectives

Lorsque nous avons initié ce travail visant à caractériser le contenu protéique et les fonctions des structures de Maurer, les connaissances sur ce compartiment étaient très parcellaires. Leur rôle dans le transport de protéines parasitaires vers la membrane érythrocytaire avait été établi, notamment par les études du transport de Pf332 (Hinterberg, Scherf *et al.* 1994) et de PfEMP1 et HRPI (Wickham, Rug *et al.* 2001). Mais le mécanisme du transport n'avait pas été étudié, et les marqueurs golgiens, dont les protéines homologues aux protéines de la machinerie de transport de la voie COPII, n'ont été identifiés au sein des structures de Maurer qu'ultérieurement (Albano, Berman *et al.* 1999) (Adisa, Albano *et al.* 2001) (Wickert, Rohrbach *et al.* 2003). Le seul indice de l'analogie entre les structures de Maurer et l'appareil de Golgi était alors la présence dans les structures de Maurer de la protéine 41.2, homologue de Bet3, une protéine participant au transport de protéines au niveau de l'appareil de Golgi chez la Levure (Jiang, Scarpa *et al.* 1998; Nacer, Berry *et al.* 2001). Ces données soulignaient l'importance fonctionnelle des structures de Maurer, un compartiment sécrétoire exporté hors du parasite, participant au transport de protéines impliquées dans la formation des knobs et la variation antigénique. La seule protéine résidente des structures de Maurer alors connue était PfSBP1, dont on supposait qu'elle ancrait les structures de Maurer à la membrane érythrocytaire (Blisnick, Morales Betoulle *et al.* 2000). Les données sur les structures de Maurer se sont beaucoup étoffées pendant la période de la thèse, et ont en particulier souligné l'importance fonctionnelle de ce compartiment et son rôle dans le transport de protéines parasitaires à la membrane érythrocytaire (Kaviratne, Khan *et al.* 2002)(Haeggstrom, Kironde *et al.* 2004). L'étude du contenu protéique des structures de Maurer est ainsi apparue de plus en plus pertinente au fur et à mesure même de la progression du travail de thèse.

Nous avons décidé de privilégier une approche fonctionnelle et protéomique parce que celle-ci semblait mieux adaptée pour l'identification directe de protéines ou d'activités enzymatiques associées aux structures de Maurer, dont nous souhaitions ensuite étudier la fonction et l'importance biologique. Cette approche a été permise par la mise au point d'une

méthode de préparation des structures de Maurer, qui consiste en la préparation de fantômes d'érythrocytes parasités, et repose sur l'association des structures de Maurer à la membrane érythrocytaire (Blisnick, Morales Betoulle *et al.* 2000).

Nous avions pour objectif dans un premier temps de mieux caractériser les interactions entre les structures de Maurer et la membrane érythrocytaire, en étudiant le rôle de la protéine PfSBP1, préalablement caractérisée au laboratoire. Nous avons montré que PfSBP1 interagit, par son domaine exposé dans le cytoplasme du globule rouge, avec la protéine érythrocytaire LANCL1, dont la fonction n'est pas connue (Bauer, Mayer *et al.* 2000). Mais l'interaction entre PfSBP1 et LANCL1 étant restreinte aux phases tardives du développement érythrocytaire, l'hypothèse selon laquelle cette interaction participerait à l'ancrage des structures de Maurer à la membrane érythrocytaire a été invalidée. Nous pensons donc que cette interaction, qui intervient tardivement, pourrait avoir pour effet de rigidifier la membrane érythrocytaire, et, de ce fait, d'éviter une rupture précoce de la membrane érythrocytaire et la libération de mérozoïtes immatures. Par ailleurs, nous avons montré que l'interaction entre PfSBP1 et LANCL1 est corrélée à la phosphorylation de PfSBP1 : parmi les deux formes phosphorylées de PfSBP1 détectées, seule la forme la plus phosphorylée se lie à LANCL1 *in vitro*. La proportion relative des deux formes phosphorylées de PfSBP1 varie au cours du cycle, ce qui suggère l'existence d'événements de phosphorylation et de déphosphorylation dans la lumière des structures de Maurer. De fait, nous avons identifié dans la lumière des structures de Maurer la protéine phosphatase parasitaire PfPP1, dont nous avons montré qu'elle interagit avec la protéine PfSBP1. De façon tout à fait intéressante, l'utilisation d'un inhibiteur spécifique des phosphatases de type PP1 ne modifie pas le profil des protéines phosphorylées au sein du globule rouge parasité de façon significative (Bhattacharyya, Hong *et al.* 2002), mais provoque une accumulation de la forme la plus phosphorylée de PfSBP1 et a pour effet d'inhiber la libération des mérozoïtes. Ceci renforce l'hypothèse selon laquelle l'interaction entre PfSBP1 et LANCL1 rigidifie la membrane érythrocytaire de manière à éviter sa rupture précoce. Des expériences de mutagenèse dirigée de la protéine PfSBP1, au niveau des sites d'interaction avec PfPP1 permettraient probablement de préciser l'importance de ce phénomène. Ainsi, l'ensemble de ces résultats illustre le fait que les structures de Maurer constituent un compartiment dynamique, qui peut établir des interactions protéiques labiles, selon un processus régulé au cours du développement parasitaire. Par ailleurs, l'étude des différents acteurs moléculaires et des réactions intermédiaires de la voie de signalisation que nous avons mise en évidence au sein

des structures de Maurer est d'autant plus stimulante que celle-ci participe au processus essentiel de libération des mérozoïtes hors du globule rouge parasité.

Nous nous sommes également intéressés à ce processus de libération des mérozoïtes en cherchant à caractériser les protéases à sérine impliquées dans ce phénomène. En effet, jusqu'à présent les études n'ont identifié aucune protéase participant à ce processus, pourtant sensible aux inhibiteurs de protéases (Lyon and Haynes 1986; Wickham, Culvenor *et al.* 2003). Les travaux que nous avons menés reposent sur l'hypothèse selon laquelle ces enzymes ne sont délivrées à la membrane érythrocytaire qu'au moment adéquat et pourraient être stockées préalablement dans un compartiment tel que les structures de Maurer. Afin d'identifier ces enzymes, nous avons utilisé une approche originale, à la fois protéomique et fonctionnelle, permettant de purifier directement les sérylhydrolases actives associées aux préparations de fantômes de globules rouges parasités (Kidd, Liu *et al.* 2001). Ces travaux ont conduit à l'identification de la protéine RhopH2, précédemment identifiée comme appartenant au complexe protéique RhopH, localisé dans les rhoptries (Cooper, Ingram *et al.* 1988; Lustigman, Anders *et al.* 1988). Nous avons montré que cette protéine est effectivement exportée dans les structures de Maurer, de même que RhopH3, une autre protéine du complexe RhopH (Sam-Yellowe, Fujioka *et al.* 2001). Ce transport s'opère dès le stade trophozoïte mûr, avant la schizogonie et la formation des rhoptries. La voie d'adressage des protéines aux rhoptries est partiellement connue chez *P. falciparum*, elle met en jeu l'appareil de sécrétion classique (Howard and Schmidt 1995; Baldi, Andrews *et al.* 2000). Il est donc peu probable que les protéines du complexe RhopH exportées dans les structures de Maurer soient destinées aux rhoptries ; nous pensons que ces protéines exercent une fonction particulière lorsqu'elles sont exportées dans les structures de Maurer, fonction qui pourrait être différente de celle qu'elles exercent dans les rhoptries. En effet, le complexe RhopH pourrait intervenir dans l'interaction entre le mérozoïte et sa cellule hôte lors de l'invasion (Sam-Yellowe and Perkins 1991; Doury, Bonnefoy *et al.* 1994), et jouer d'autres rôles au sein des structures de Maurer. A ce sujet, nous sommes actuellement en train d'étudier l'activité protéolytique de RhopH2, afin de préciser sa fonction, notamment au sein des structures de Maurer, et de déterminer si cette protéine participe à la libération des mérozoïtes. Alternativement, certains auteurs proposent que le complexe RhopH, lorsqu'il est inséré dans la membrane de la vacuole parasitophore lors de l'invasion, sert de machinerie de transport des protéines, mise en place dans le cytoplasme du globule rouge antérieurement à toute synthèse de protéines parasitaires (Ling, Florens *et al.* 2004) ; il est alors tentant de proposer

que le complexe RhopH exerce la même fonction de transporteur de protéines au sein des structures de Maurer. Plus généralement, ces résultats illustrent le fait que la fonction d'une protéine peut varier en fonction du stade de développement envisagé, et en fonction de sa localisation subcellulaire. Il est intéressant de réfléchir au fait que, à l'instar des protéines du complexe RhopH, certaines protéines qui semblent bien caractérisées à un stade donné peuvent avoir une localisation autre et participer à des processus cellulaires très différents à d'autres étapes du développement.

Les deux axes de recherche que nous venons de détailler ont certes permis de mettre en évidence un certain nombre de processus cellulaires se produisant au niveau des structures de Maurer, mais les études ne concernent qu'un petit nombre de protéines et ne permettent pas d'établir un panorama des fonctions associées à ce compartiment. Nous avons donc envisagé une approche plus générale, qui réaliserait une analyse de la composition protéique globale des structures de Maurer. Pour cela nous avons utilisé une méthode de marquage métabolique, qui permet de distinguer les protéines parasitaires des protéines érythrocytaires par spectrométrie de masse, et de restreindre les analyses de spectrométrie de masse en tandem aux seules protéines parasitaires. Notre analyse a identifié plus de 70 protéines parasitaires associées aux préparations de fantômes érythrocytaires, qui contiennent les structures de Maurer, mais aussi la membrane érythrocytaire et le squelette sous-membranaire. Certaines des protéines identifiées sont caractéristiques d'un compartiment sécrétoire : endoplasmine, protéine disulfide isomérase, protéines de choc thermique. D'autres ont une fonction biologique connue, et si leur localisation au sein des structures de Maurer était avérée, cela suggèrerait que les structures de Maurer participent à des processus biologiques aussi variés que la signalisation cellulaire utilisant les petites protéines G des familles *Ran* et *Rack* et la protéine 14-3-3, la synthèse de composés membranaires (phosphatidylcholine) ou encore la synthèse de composés des acides nucléiques (purines). Tous ces résultats ouvrent autant de perspectives d'étude des structures de Maurer. Ainsi, l'étude des voies de signalisation mises en jeu au niveau des structures de Maurer permettrait peut-être de déterminer si des événements ayant lieu dans le milieu extracellulaire, par exemple l'interaction avec une cellule endothéliale ou un érythrocyte sain, sont relayés par des signaux dans le globule rouge parasité et ont des effets biologiques sur le parasite. De même, une meilleure connaissance des réactions de synthèses métaboliques ayant lieu dans les structures de Maurer s'avèrerait utile dans le cadre d'études visant à développer des inhibiteurs spécifiques d'une voie métabolique.

Par ailleurs, notre étude a identifié 13 protéines hypothétiques, déduites de l'annotation du génome, en association avec les préparations de fantômes érythrocytaires. Nous avons caractérisé six d'entre elles comme étant des protéines solubles ou transmembranaires des structures de Maurer. La prochaine étape consistera à préciser leur fonction. Pour cela, l'étude de la cinétique de leur synthèse indiquera si elles sont susceptibles d'intervenir dans les étapes précoces ou tardives du développement érythrocytaire. Certaines de ces protéines ont des répétitions d'acides aminés basiques, qui pourraient établir des interactions avec des protéines de la lumière des structures de Maurer : l'identification de ces protéines permettrait de préciser leur fonction putative. De façon tout à fait intéressante, ces protéines n'ayant aucune homologie avec des protéines connues, elles pourraient intervenir dans des processus biologiques spécifiques au parasite. Des études de disruption génique ont été entreprises dans le laboratoire d'Alan Cowman (Walter and Eliza Hall Institute, Melbourne, Australie) ; elles permettront d'établir si ces protéines sont essentielles ou non au développement parasitaire, et si certaines peuvent être validées comme cibles thérapeutiques potentielles. En effet, de telles protéines devront être à la fois essentielles au développement du parasite, et participer à des processus biologiques qui ne sont pas conservés chez l'hôte, afin de limiter les effets secondaires de la drogue. Mais la question du stade auquel la protéine intervient a aussi son importance pour la définition d'une drogue et de son action : selon qu'une protéine intervient au cours d'une étape précoce ou tardive du développement du parasite, le traitement sera suivi immédiatement d'effet, ou avec une latence de 48 heures… La variabilité d'une protéine que l'on étudie comme cible thérapeutique est également un paramètre important : idéalement les drogues doivent pouvoir être efficaces sur différents isolats géographiques, ce qui implique que la cible soit relativement peu variable.

Un autre intérêt de notre étude réside dans le fait d'établir un échantillon de protéines localisées dans les structures de Maurer plus vaste que ce qui était connu jusqu'à présent. Ainsi, la comparaison des signaux d'adressage, des caractéristiques générales et de la topologie de ces protéines peut permettre de préciser certaines règles générales régissant le transport des protéines vers les structures de Maurer, ou du moins suggérer des pistes de recherche. Par exemple, le motif carboxy-terminal formé de deux domaines séparés par quelques résidus seulement est partagé par trois des protéines que nous avons identifiées, et pourrait participer soit à leur adressage soit à leur fonction biologique.

Par ailleurs, les résultats que nous avons obtenus suggèrent qu'il existe un phénomène de colinéarité entre la localisation chromosomique de certains gènes et la localisation

subcellulaire de la protéine qu'ils spécifient. En effet, notre étude identifie au sein des préparations de fantômes érythrocytaires les produits de cinq gènes contigus, localisés sur le chromosome 5. Deux de ces protéines, dont PfSBP1, sont localisées dans les structures de Maurer, et nous pensons que ce groupement de gènes pourrait spécifier des protéines exportées vers les structures de Maurer. Il serait très intéressant de savoir s'il existe chez *P. falciparum* d'autres groupements de gènes spécifiant des protéines destinées aux structures de Maurer, ou à d'autres compartiments subcellulaires ; il serait également intéressant de voir si cette organisation est conservée chez d'autres espèces de *Plasmodium*. La question de savoir comment un tel lien entre l'organisation chromosomique et la localisation subcellulaire des protéines spécifiées pourrait apparaître au cours de l'évolution reste ouverte.

Ainsi, l'étude protéomique des préparations de fantômes de globules rouges parasités a permis de mieux connaître les protéines contenues dans les structures de Maurer, en identifiant plusieurs protéines associées à ce compartiment ou susceptibles de l'être. Ce travail a également produit nombre d'informations qui permettent de mieux appréhender la nature et la diversité des événements moléculaires et des rôles biologiques associés aux structures de Maurer, et suggèrent plusieurs pistes de recherche prometteuses. De plus, les données que nous avons obtenues peuvent être interprétées et exploitées selon des axes de recherche très variés : les résultats peuvent être comparés à des données d'analyses transcriptomiques, ou bien confrontés aux résultats d'études ciblées sur un processus biologique précis. Mais ces résultats peuvent aussi être considérés dans une perspective plus large. En effet, nous nous sommes jusqu'à présent concentrés sur les pistes de recherche centrées autour des structures de Maurer, mais, dans la mesure où les préparations de fantômes que nous avons analysées renferment aussi la membrane érythrocytaire et le squelette sous-membranaire du globule rouge, ces résultats peuvent être exploités dans le cadre de l'étude de ces différents composants du globule rouge.

Références bibliographiques

Adisa, A., F. R. Albano, J. Reeder, M. Foley and L. Tilley (2001). "Evidence for a role for a Plasmodium falciparum homologue of Sec31p in the export of proteins to the surface of malaria parasite-infected erythrocytes." J Cell Sci **114**(Pt 18): 3377-86.

Adisa, A., M. Rug, M. Foley and L. Tilley (2002). "Characterisation of a delta-COP homologue in the malaria parasite, Plasmodium falciparum." Mol Biochem Parasitol **123**(1): 11-21.

Adisa, A., M. Rug, N. Klonis, M. Foley, A. F. Cowman and L. Tilley (2003). "The signal sequence of exported protein-1 directs the green fluorescent protein to the parasitophorous vacuole of transfected malaria parasites." J Biol Chem **278**(8): 6532-42.

Aikawa, M., L. H. Miller, J. R. Rabbege and N. Epstein (1981). "Freeze-fracture study on the erythrocyte membrane during malarial parasite invasion." J Cell Biol **91**(1): 55-62.

Alano, P. and R. Carter (1990). "Sexual differentiation in malaria parasites." Annu Rev Microbiol **44**: 429-49.

Albano, F. R., A. Berman, N. La Greca, A. R. Hibbs, M. Wickham, M. Foley and L. Tilley (1999). "A homologue of Sar1p localises to a novel trafficking pathway in malaria-infected erythrocytes." Eur J Cell Biol **78**(7): 453-62.

Ansorge, I., J. Benting, S. Bhakdi and K. Lingelbach (1996). "Protein sorting in Plasmodium falciparum-infected red blood cells permeabilized with the pore-forming protein streptolysin O." Biochem J **315**(Pt 1): 307-14.

Atkinson, C. T. and M. Aikawa (1990). "Ultrastructure of malaria-infected erythrocytes." Blood Cells **16**(2-3): 351-68.

Atkinson, C. T., M. Aikawa, T. Fujino, L. Q. Tam, G. S. Hui and W. A. Siddiqui (1987). "Ultrastructural localization of protective and nonprotective Plasmodium falciparum proteins using serum samples from vaccinated Aotus monkeys." J Parasitol **73**(6): 1235-40.

Atkinson, C. T., M. Aikawa, G. Perry, T. Fujino, V. Bennett, E. A. Davidson and R. J. Howard (1988). "Ultrastructural localization of erythrocyte cytoskeletal and integral membrane proteins in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes." Eur J Cell Biol **45**(2): 192-9.

Atkinson, C. T., M. Aikawa, E. P. Rock, K. Marsh, P. M. Andrysiak, G. H. Campbell, W. E. Collins and R. J. Howard (1987). "Ultrastructure of the erythrocytic stages of Plasmodium malariae." J Protozool **34**(3): 267-74.

Attaran, A. (2004). "Where did it all go wrong?" Nature **430**(7002): 932-3.

Baldi, D. L., K. T. Andrews, R. F. Waller, D. S. Roos, R. F. Howard, B. S. Crabb and A. F. Cowman (2000). "RAP1 controls rhoptry targeting of RAP2 in the malaria parasite Plasmodium falciparum." Embo J **19**(11): 2435-43.

Banerjee, R., J. Liu, W. Beatty, L. Pelosof, M. Klemba and D. E. Goldberg (2002). "Four plasmepsins are active in the Plasmodium falciparum food vacuole, including a protease with an active-site histidine." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(2): 990-5.

Bannister, L. H., J. M. Hopkins, R. E. Fowler, S. Krishna and G. H. Mitchell (2000). "A brief illustrated guide to the ultrastructure of Plasmodium falciparum asexual blood stages." Parasitol Today **16**(10): 427-33.

Bannister, L. H., J. M. Hopkins, G. Margos, A. R. Dluzewski and G. H. Mitchell (2004). "Three-dimensional ultrastructure of the ring stage of Plasmodium falciparum: evidence for export pathways." Microsc Microanal **10**(5): 551-62.

Bannister, L. H. and G. H. Mitchell (1989). "The fine structure of secretion by Plasmodium knowlesi merozoites during red cell invasion." J Protozool **36**(4): 362-7.

Bannister, L. H., G. H. Mitchell, G. A. Butcher and E. D. Dennis (1986). "Lamellar membranes associated with rhoptries in erythrocytic merozoites of Plasmodium knowlesi: a clue to the mechanism of invasion." Parasitology **92**(Pt 2): 291-303.

Banting, G., J. Benting and K. Lingelbach (1995). "A minimalist view of the secretory pathway in Plasmodium falciparum." Trends Cell Biol **5**(9): 340-3.

Banumathy, G., V. Singh and U. Tatu (2002). "Host chaperones are recruited in membrane-bound complexes by Plasmodium falciparum." J Biol Chem **277**(6): 3902-12.

Barale, J. C., T. Blisnick, H. Fujioka, P. M. Alzari, M. Aikawa, C. Braun-Breton and G. Langsley (1999). "Plasmodium falciparum subtilisin-like protease 2, a merozoite candidate for the merozoite surface protein 1-42 maturase." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(11): 6445-50.

Barlowe, C. (2002). "COPII-dependent transport from the endoplasmic reticulum." Curr Opin Cell Biol **14**(4): 417-22.

Barlowe, C. (2003). "Molecular recognition of cargo by the COPII complex: a most accommodating coat." Cell **114**(4): 395-7.

Barragan, A., D. Spillmann, P. G. Kremsner, M. Wahlgren and J. Carlson (1999). "Plasmodium falciparum: molecular background to strain-specific rosette disruption by glycosaminoglycans and sulfated glycoconjugates." Exp Parasitol **91**(2): 133-43.

Bauer, H., H. Mayer, A. Marchler-Bauer, U. Salzer and R. Prohaska (2000). "Characterization of p40/GPR69A as a peripheral membrane protein related to the lantibiotic synthetase component C." Biochem Biophys Res Commun **275**(1): 69-74.

Behari, R. and K. Haldar (1994). "Plasmodium falciparum: protein localization along a novel, lipid-rich tubovesicular membrane network in infected erythrocytes." Exp Parasitol **79**(3): 250-9.

Ben Mamoun, C., I. Y. Gluzman, C. Hott, S. K. MacMillan, A. S. Amarakone, D. L. Anderson, J. M. Carlton, J. B. Dame, D. Chakrabarti, R. K. Martin, B. H. Brownstein and D. E. Goldberg (2001). "Co-ordinated programme of gene expression during asexual intraerythrocytic development of the human malaria parasite Plasmodium falciparum revealed by microarray analysis." Mol Microbiol **39**(1): 26-36.

Benting, J. H., A. G. Rietveld and K. Simons (1999). "N-Glycans mediate the apical sorting of a GPI-anchored, raft-associated protein in Madin-Darby canine kidney cells." J Cell Biol **146**(2): 313-20.

Bhattacharyya, M. K., Z. Hong, D. Kongkasuriyachai and N. Kumar (2002). "Plasmodium falciparum protein phosphatase type 1 functionally complements a glc7 mutant in Saccharomyces cerevisiae." Int J Parasitol **32**(6): 739-47.

Bigay, J., P. Gounon, S. Robineau and B. Antonny (2003). "Lipid packing sensed by ArfGAP1 couples COPI coat disassembly to membrane bilayer curvature." Nature **426**(6966): 563-6.

Birago, C., V. Albanesi, F. Silvestrini, L. Picci, E. Pizzi, P. Alano, T. Pace and M. Ponzi (2003). "A gene-family encoding small exported proteins is conserved across Plasmodium genus." Mol Biochem Parasitol **126**(2): 209-18.

Blackman, M. J., E. D. Dennis, E. M. Hirst, C. H. Kocken, T. J. Scott-Finnigan and A. W. Thomas (1996). "Plasmodium knowlesi: secondary processing of the malaria merozoite surface protein-1." Exp Parasitol **83**(2): 229-39.

Blackman, M. J., H. Fujioka, W. H. Stafford, M. Sajid, B. Clough, S. L. Fleck, M. Aikawa, M. Grainger and F. Hackett (1998). "A subtilisin-like protein in secretory organelles of Plasmodium falciparum merozoites." J Biol Chem **273**(36): 23398-409.

Blackman, M. J., H. Whittle and A. A. Holder (1991). "Processing of the Plasmodium falciparum major merozoite surface protein-1: identification of a 33-kilodalton secondary processing product which is shed prior to erythrocyte invasion." Mol Biochem Parasitol **49**(1): 35-44.

Blisnick, T., M. E. Morales Betoulle, J. C. Barale, P. Uzureau, L. Berry, S. Desroses, H. Fujioka, D. Mattei and C. Braun Breton (2000). "Pfsbp1, a Maurer's cleft Plasmodium falciparum protein, is associated with the erythrocyte skeleton." Mol Biochem Parasitol **111**(1): 107-21.

Blythe, J. E., T. Surentheran and P. R. Preiser (2004). "STEVOR--a multifunctional protein?" Mol Biochem Parasitol **134**(1): 11-5.

Bozdech, Z., M. Llinas, B. L. Pulliam, E. D. Wong, J. Zhu and J. L. DeRisi (2003). "The Transcriptome of the Intraerythrocytic Developmental Cycle of Plasmodium falciparum." PLoS Biol **1**(1): E5. Epub 2003 Aug 18.

Bozdech, Z., J. VanWye, K. Haldar and E. Schurr (1998). "The human malaria parasite Plasmodium falciparum exports the ATP-binding cassette protein PFGCN20 to membrane structures in the host red blood cell." Mol Biochem Parasitol **97**(1-2): 81-95.

Braun Breton, C., T. L. Rosenberry and L. H. Pereira da Silva (1990). "Glycolipid anchorage of Plasmodium falciparum surface antigens." Res Immunol **141**(8): 743-55.

Braun-Breton, C., T. Blisnick, P. Barbot, R. Bulow, L. Pereira da Silva and G. Langsley (1992). "Plasmodium falciparum and Plasmodium chabaudi: characterization of glycosylphosphatidylinositol-degrading activities." Exp Parasitol **74**(4): 452-62.

Braun-Breton, C., T. L. Rosenberry and L. P. da Silva (1988). "Induction of the proteolytic activity of a membrane protein in Plasmodium falciparum by phosphatidyl inositol-specific phospholipase C." Nature **332**(6163): 457-9.

Bray, P. G., O. Janneh, K. J. Raynes, M. Mungthin, H. Ginsburg and S. A. Ward (1999). "Cellular uptake of chloroquine is dependent on binding to ferriprotoporphyrin IX and is independent of NHE activity in Plasmodium falciparum." J Cell Biol **145**(2): 363-76.

Bretscher, M. S. (1996). "Moving membrane up to the front of migrating cells." Cell **85**(4): 465-7.

Brown, D. A. and E. London (1998). "Functions of lipid rafts in biological membranes." Annu Rev Cell Dev Biol **14**: 111-36.

Brown, H. J. and R. L. Coppel (1991). "Primary structure of a Plasmodium falciparum rhoptry antigen." Mol Biochem Parasitol **49**(1): 99-110.

Carter, R., K. N. Mendis, L. H. Miller, L. Molineaux and A. Saul (2000). "Malaria transmission-blocking vaccines--how can their development be supported?" Nat Med **6**(3): 241-4.

Chen, Y. A. and R. H. Scheller (2001). "SNARE-mediated membrane fusion." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(2): 98-106.

Chevallet, M., E. Wagner, S. Luche, A. van Dorsselaer, E. Leize-Wagner and T. Rabilloud (2003). "Regeneration of peroxiredoxins during recovery after oxidative stress: only some overoxidized peroxiredoxins can be reduced during recovery after oxidative stress." J Biol Chem **278**(39): 37146-53. Epub 2003 Jul 8.

Clyde, D. F., H. Most, V. C. McCarthy and J. P. Vanderberg (1973). "Immunization of man against sporozite-induced falciparum malaria." Am J Med Sci **266**(3): 169-77.

Cohen, P. and S. Frame (2001). "The renaissance of GSK3." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(10): 769-76.

Cohen, P. T. (2002). "Protein phosphatase 1--targeted in many directions." J Cell Sci **115**(Pt 2): 241-56.

Cooke, B. M., K. Lingelbach, L. H. Bannister and L. Tilley (2004). "Protein trafficking in Plasmodium falciparum-infected red blood cells." Trends Parasitol **20**(12): 581-9.

Cooper, J. A., L. T. Ingram, G. R. Bushell, C. A. Fardoulys, D. Stenzel, L. Schofield and A. J. Saul (1988). "The 140/130/105 kilodalton protein complex in the rhoptries of Plasmodium falciparum consists of discrete polypeptides." Mol Biochem Parasitol **29**(2-3): 251-60.

Cortes, G. T., E. Winograd and M. F. Wiser (2003). "Characterization of proteins localized to a subcellular compartment associated with an alternate secretory pathway of the malaria parasite." Mol Biochem Parasitol **129**(2): 127-35.

Couffin, S., R. Hernandez-Rivas, T. Blisnick and D. Mattei (1998). "Characterisation of PfSec61, a Plasmodium falciparum homologue of a component of the translocation machinery at the endoplasmic reticulum membrane of eukaryotic cells." Mol Biochem Parasitol **92**(1): 89-98.

Crabb, B. S., B. M. Cooke, J. C. Reeder, R. F. Waller, S. R. Caruana, K. M. Davern, M. E. Wickham, G. V. Brown, R. L. Coppel and A. F. Cowman (1997). "Targeted gene disruption shows that knobs enable malaria-infected red cells to cytoadhere under physiological shear stress." Cell **89**(2): 287-96.

Craig, A. (2000). "Malaria: a new gene family (clag) involved in adhesion." Parasitol Today **16**(9): 366-7; discussion 405.

Dhawan, S., M. Dua, A. H. Chishti and M. Hanspal (2003). "Ankyrin peptide blocks falcipain-2-mediated malaria parasite release from red blood cells." J Biol Chem **278**(32): 30180-6. Epub 2003 May 29.

de Castro, F. A., G. E. Ward, R. Jambou, G. Attal, V. Mayau, G. Jaureguiberry, C. Braun-Breton, D. Chakrabarti and G. Langsley (1996). "Identification of a family of Rab G-proteins in Plasmodium falciparum and a detailed characterisation of pfrab6." Mol Biochem Parasitol **80**(1): 77-88.

Dell'Angelica, E. C., C. Mullins and J. S. Bonifacino (1999). "AP-4, a novel protein complex related to clathrin adaptors." J Biol Chem **274**(11): 7278-85.

Desai, S. A., S. M. Bezrukov and J. Zimmerberg (2000). "A voltage-dependent channel involved in nutrient uptake by red blood cells infected with the malaria parasite." Nature **406**(6799): 1001-5.

Dieckmann-Schuppert, A., S. Bender, M. Odenthal-Schnittler, E. Bause and R. T. Schwarz (1992). "Apparent lack of N-glycosylation in the asexual intraerythrocytic stage of Plasmodium falciparum." Eur J Biochem **205**(2): 815-25.

Doerig, C. (2004). "Protein kinases as targets for anti-parasitic chemotherapy." Biochim Biophys Acta **1697**(1-2): 155-68.

Doury, J. C., S. Bonnefoy, N. Roger, J. F. Dubremetz and O. Mercereau-Puijalon (1994). "Analysis of the high molecular weight rhoptry complex of Plasmodium falciparum using monoclonal antibodies." Parasitology **108**(Pt 3): 269-80.

Droucheau, E., A. Primot, V. Thomas, D. Mattei, M. Knockaert, C. Richardson, P. Sallicandro, P. Alano, A. Jafarshad, B. Baratte, C. Kunick, D. Parzy, L. Pearl, C. Doerig and L. Meijer (2004). "Plasmodium falciparum glycogen synthase kinase-3: molecular model, expression, intracellular localisation and selective inhibitors." Biochim Biophys Acta **1697**(1-2): 181-96.

Dua, M., P. Raphael, P. S. Sijwali, P. J. Rosenthal and M. Hanspal (2001). "Recombinant falcipain-2 cleaves erythrocyte membrane ankyrin and protein 4.1." Mol Biochem Parasitol **116**(1): 95-9.

Dubremetz, J. F., N. Garcia-Reguet, V. Conseil and M. N. Fourmaux (1998). "Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa." Int J Parasitol **28**(7): 1007-13.

Egee, S., F. Lapaix, G. Decherf, H. M. Staines, J. C. Ellory, C. Doerig and S. L. Thomas (2002). "A stretch-activated anion channel is up-regulated by the malaria parasite Plasmodium falciparum." J Physiol **542**(Pt 3): 795-801.

Eksi, S., A. Stump, S. L. Fanning, M. I. Shenouda, H. Fujioka and K. C. Williamson (2002). "Targeting and sequestration of truncated Pfs230 in an intraerythrocytic compartment during Plasmodium falciparum gametocytogenesis." Mol Microbiol **44**(6): 1507-16.

Elford, B. C., G. M. Cowan and D. J. Ferguson (1995). "Parasite-regulated membrane transport processes and metabolic control in malaria-infected erythrocytes." Biochem J **308**(Pt 2): 361-74.

Ellgaard, L. and A. Helenius (2003). "Quality control in the endoplasmic reticulum." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(3): 181-91.

Elmendorf, H. G. and K. Haldar (1993). "Identification and localization of ERD2 in the malaria parasite Plasmodium falciparum: separation from sites of sphingomyelin synthesis and implications for organization of the Golgi." Embo J **12**(12): 4763-73.

Elmendorf, H. G. and K. Haldar (1994). "Plasmodium falciparum exports the Golgi marker sphingomyelin synthase into a tubovesicular network in the cytoplasm of mature erythrocytes." J Cell Biol **124**(4): 449-62.

Etzion, Z. and M. E. Perkins (1989). "Localization of a parasite encoded protein to erythrocyte cytoplasmic vesicles of Plasmodium falciparum-infected cells." Eur J Cell Biol **48**(2): 174-9.

Ferguson, M. A. (1999). "The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research." J Cell Sci **112**(Pt 17): 2799-809.

Fernandez, V., M. Hommel, Q. Chen, P. Hagblom and M. Wahlgren (1999). "Small, clonally variant antigens expressed on the surface of the Plasmodium falciparum-infected erythrocyte are encoded by the rif gene family and are the target of human immune responses." J Exp Med **190**(10): 1393-404.

Fevrier, B. and G. Raposo (2004). "Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages." Curr Opin Cell Biol **16**(4): 415-21.

Fiedler, K., R. G. Parton, R. Kellner, T. Etzold and K. Simons (1994). "VIP36, a novel component of glycolipid rafts and exocytic carrier vesicles in epithelial cells." Embo J **13**(7): 1729-40.

Florens, L., X. Liu, Y. Wang, S. Yang, O. Schwartz, M. Peglar, D. J. Carucci, J. R. Yates, 3rd and Y. Wub (2004). "Proteomics approach reveals novel proteins on the surface of malaria-infected erythrocytes." Mol Biochem Parasitol **135**(1): 1-11.

Florens, L., M. P. Washburn, J. D. Raine, R. M. Anthony, M. Grainger, J. D. Haynes, J. K. Moch, N. Muster, J. B. Sacci, D. L. Tabb, A. A. Witney, D. Wolters, Y. Wu, M. J. Gardner, A. A. Holder, R. E. Sinden, J. R. Yates and D. J. Carucci (2002). "A proteomic view of the Plasmodium falciparum life cycle." Nature **419**(6906): 520-6.

Florent, I., E. Mouray, F. Dali Ali, H. Drobecq, S. Girault, J. Schrevel, C. Sergheraert and P. Grellier (2000). "Cloning of Plasmodium falciparum protein disulfide isomerase homologue by affinity purification using the antiplasmodial inhibitor 1,4-bis[3-[N-(cyclohexyl methyl)amino]propyl]piperazine." FEBS Lett **484**(3): 246-52.

Foley, M. and L. Tilley (1998). "Protein trafficking in malaria-infected erythrocytes." Int J Parasitol **28**(11): 1671-80.

Folsch, H., H. Ohno, J. S. Bonifacino and I. Mellman (1999). "A novel clathrin adaptor complex mediates basolateral targeting in polarized epithelial cells." Cell **99**(2): 189-98.

Foth, B. J., S. A. Ralph, C. J. Tonkin, N. S. Struck, M. Fraunholz, D. S. Roos, A. F. Cowman and G. I. McFadden (2003). "Dissecting apicoplast targeting in the malaria parasite Plasmodium falciparum." Science **299**(5607): 705-8.

Fowler, R. E., R. E. Fookes, F. Lavin, L. H. Bannister and G. H. Mitchell (1998). "Microtubules in Plasmodium falciparum merozoites and their importance for invasion of erythrocytes." Parasitology **117**(Pt 5): 425-33.

Freitas-Junior, L. H., E. Bottius, L. A. Pirrit, K. W. Deitsch, C. Scheidig, F. Guinet, U. Nehrbass, T. E. Wellems and A. Scherf (2000). "Frequent ectopic recombination of virulence factor genes in telomeric chromosome clusters of P. falciparum." Nature **407**(6807): 1018-22.

Garcia, A., X. Cayla, S. Barik and G. Langsley (1999). "A family of PP2 phosphatases in Plasmodium falciparum and parasitic protozoa." Parasitol Today **15**(3): 90-2.

Gardner, M. J., N. Hall, E. Fung, O. White, M. Berriman, R. W. Hyman, J. M. Carlton, A. Pain, K. E. Nelson, S. Bowman, I. T. Paulsen, K. James, J. A. Eisen, K. Rutherford, S. L. Salzberg, A. Craig, S. Kyes, M. S. Chan, V. Nene, S. J. Shallom, B. Suh, J. Peterson, S. Angiuoli, M. Pertea, J. Allen, J. Selengut, D. Haft, M. W. Mather, A. B. Vaidya, D. M. Martin, A. H. Fairlamb, M. J. Fraunholz, D. S. Roos, S. A. Ralph, G. I. McFadden, L. M. Cummings, G. M. Subramanian, C. Mungall, J. C. Venter, D. J. Carucci, S. L. Hoffman, C. Newbold, R. W. Davis, C. M. Fraser and B. Barrell (2002). "Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum." Nature **419**(6906): 498-511.

Gardner, M. J., H. Tettelin, D. J. Carucci, L. M. Cummings, L. Aravind, E. V. Koonin, S. Shallom, T. Mason, K. Yu, C. Fujii, J. Pederson, K. Shen, J. Jing, C. Aston, Z. Lai, D. C. Schwartz, M. Pertea, S. Salzberg, L. Zhou, G. G. Sutton, R. Clayton, O. White, H. O. Smith, C. M. Fraser, S. L. Hoffman and et al. (1998). "Chromosome 2 sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum." Science **282**(5391): 1126-32.

Gavigan, C. S., J. P. Dalton and A. Bell (2001). "The role of aminopeptidases in haemoglobin degradation in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes." Mol Biochem Parasitol **117**(1): 37-48.

Giribaldi, G., D. Ulliers, F. Mannu, P. Arese and F. Turrini (2001). "Growth of Plasmodium falciparum induces stage-dependent haemichrome formation, oxidative aggregation of band 3, membrane deposition of complement and antibodies, and phagocytosis of parasitized erythrocytes." Br J Haematol **113**(2): 492-9.

Girod, A., B. Storrie, J. C. Simpson, L. Johannes, B. Goud, L. M. Roberts, J. M. Lord, T. Nilsson and R. Pepperkok (1999). "Evidence for a COP-I-independent transport route from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum." Nat Cell Biol **1**(7): 423-30.

Glenister, F. K., R. L. Coppel, A. F. Cowman, N. Mohandas and B. M. Cooke (2002). "Contribution of parasite proteins to altered mechanical properties of malaria-infected red blood cells." Blood **99**(3): 1060-3.

Gormley, J. A., R. J. Howard and T. F. Taraschi (1992). "Trafficking of malarial proteins to the host cell cytoplasm and erythrocyte surface membrane involves multiple pathways." J Cell Biol **119**(6): 1481-95.

Gowda, D. C. and E. A. Davidson (1999). "Protein glycosylation in the malaria parasite." Parasitol Today **15**(4): 147-52.

Gowda, D. C., P. Gupta and E. A. Davidson (1997). "Glycosylphosphatidylinositol anchors represent the major carbohydrate modification in proteins of intraerythrocytic stage Plasmodium falciparum." J Biol Chem **272**(10): 6428-39.

Grellier, P., D. Rigomier, V. Clavey, J. C. Fruchart and J. Schrevel (1991). "Lipid traffic between high density lipoproteins and Plasmodium falciparum-infected red blood cells." J Cell Biol **112**(2): 267-77.

Gu, S., S. Pan, E. M. Bradbury and X. Chen (2002). "Use of deuterium-labeled lysine for efficient protein identification and peptide de novo sequencing." Anal Chem **74**(22): 5774-85.

Gunther, K., M. Tummler, H. H. Arnold, R. Ridley, M. Goman, J. G. Scaife and K. Lingelbach (1991). "An exported protein of Plasmodium falciparum is synthesized as an integral membrane protein." Mol Biochem Parasitol **46**(1): 149-57.

H. Vial, M. L. A. (1998). Malaria : Parasite Biology, Pathogenesis, Protection. E. I. W. Sherman, The American Society for Microbiology**:** 159-175.

Hackett, F., M. Sajid, C. Withers-Martinez, M. Grainger and M. J. Blackman (1999). "PfSUB-2: a second subtilisin-like protein in Plasmodium falciparum merozoites." Mol Biochem Parasitol **103**(2): 183-95.

Hadley, T., M. Aikawa and L. H. Miller (1983). "Plasmodium knowlesi: studies on invasion of rhesus erythrocytes by merozoites in the presence of protease inhibitors." Exp Parasitol **55**(3): 306-11.

Haeggstrom, M., F. Kironde, K. Berzins, Q. Chen, M. Wahlgren and V. Fernandez (2004). "Common trafficking pathway for variant antigens destined for the surface of the Plasmodium falciparum-infected erythrocyte." Mol Biochem Parasitol **133**(1): 1-14.

Haldar, K. (1998). "Intracellular trafficking in Plasmodium-infected erythrocytes." Curr Opin Microbiol **1**(4): 466-71.

Haldar, K., A. F. de Amorim and G. A. Cross (1989). "Transport of fluorescent phospholipid analogues from the erythrocyte membrane to the parasite in Plasmodium falciparum-infected cells." J Cell Biol **108**(6): 2183-92.

Haldar, K., N. Mohandas, B. U. Samuel, T. Harrison, N. L. Hiller, T. Akompong and P. Cheresh (2002). "Protein and lipid trafficking induced in erythrocytes infected by malaria parasites." Cell Microbiol **4**(7): 383-95.

Haldar, K., B. U. Samuel, N. Mohandas, T. Harrison and N. L. Hiller (2001). "Erythrocytic vacuolar rafts induced by malaria parasites." Curr Opin Hematol **8**(2): 92-7.

Haldar, K., B. U. Samuel, N. Mohandas, T. Harrison and N. L. Hiller (2001). "Transport mechanisms in Plasmodium-infected erythrocytes: lipid rafts and a tubovesicular network." Int J Parasitol **31**(12): 1393-401.

Hanspal, M., M. Dua, Y. Takakuwa, A. H. Chishti and A. Mizuno (2002). "Plasmodium falciparum cysteine protease falcipain-2 cleaves erythrocyte membrane skeletal proteins at late stages of parasite development." Blood **100**(3): 1048-54.

Harrison, T., B. U. Samuel, T. Akompong, H. Hamm, N. Mohandas, J. W. Lomasney and K. Haldar (2003). "Erythrocyte G protein-coupled receptor signaling in malarial infection." Science **301**(5640): 1734-6.

Harsay, E. and A. Bretscher (1995). "Parallel secretory pathways to the cell surface in yeast." J Cell Biol **131**(2): 297-310.

Hawthorne, P. L., K. R. Trenholme, T. S. Skinner-Adams, T. Spielmann, K. Fischer, M. W. Dixon, M. R. Ortega, K. L. Anderson, D. J. Kemp and D. L. Gardiner (2004). "A novel Plasmodium falciparum ring stage protein, REX, is located in Maurer's clefts." Mol Biochem Parasitol **136**(2): 181-9.

Hay, S. I., C. A. Guerra, A. J. Tatem, A. M. Noor and R. W. Snow (2004). "The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future." Lancet Infect Dis **4**(6): 327-36.

Hayashi, M., S. Taniguchi, Y. Ishizuka, H. S. Kim, Y. Wataya, A. Yamamoto and Y. Moriyama (2001). "A homologue of N-ethylmaleimide-sensitive factor in the malaria

parasite Plasmodium falciparum is exported and localized in vesicular structures in the cytoplasm of infected erythrocytes in the brefeldin A-sensitive pathway." J Biol Chem **276**(18): 15249-55.

Hiller, N. L., T. Akompong, J. S. Morrow, A. A. Holder and K. Haldar (2003). "Identification of a stomatin orthologue in vacuoles induced in human erythrocytes by malaria parasites: A role for microbial raft-proteins in apicomplexan vacuole biogenesis." J Biol Chem **10**: 10.

Hiller, N. L., S. Bhattacharjee, C. van Ooij, K. Liolios, T. Harrison, C. Lopez-Estrano and K. Haldar (2004). "A host-targeting signal in virulence proteins reveals a secretome in malarial infection." Science **306**(5703): 1934-7.

Hinterberg, K., A. Scherf, J. Gysin, T. Toyoshima, M. Aikawa, J. C. Mazie, L. P. da Silva and D. Mattei (1994). "Plasmodium falciparum: the Pf332 antigen is secreted from the parasite by a brefeldin A-dependent pathway and is translocated to the erythrocyte membrane via the Maurer's clefts." Exp Parasitol **79**(3): 279-91.

Hodder, A. N., D. R. Drew, V. C. Epa, M. Delorenzi, R. Bourgon, S. K. Miller, R. L. Moritz, D. F. Frecklington, R. J. Simpson, T. P. Speed, R. N. Pike and B. S. Crabb (2003). "Enzymic, phylogenetic, and structural characterization of the unusual papain-like protease domain of Plasmodium falciparum SERA5." J Biol Chem **278**(48): 48169-77. Epub 2003 Sep 17.

Holder, A. A. (1988). "The precursor to major merozoite surface antigens: structure and role in immunity." Prog Allergy **41**: 72-97.

Howard, R. F. and C. M. Schmidt (1995). "The secretary pathway of plasmodium falciparum regulates transport of p82/RAP1 to the rhoptries." Mol Biochem Parasitol **74**(1): 43-54.

Howell, S. A., C. Withers-Martinez, C. H. Kocken, A. W. Thomas and M. J. Blackman (2001). "Proteolytic processing and primary structure of Plasmodium falciparum apical membrane antigen-1." J Biol Chem **276**(33): 31311-20. Epub 2001 Jun 8.

Huber, S. M., A. C. Uhlemann, N. L. Gamper, C. Duranton, P. G. Kremsner and F. Lang (2002). "Plasmodium falciparum activates endogenous Cl(-) channels of human erythrocytes by membrane oxidation." Embo J **21**(1_2): 22-30.

Hui, G. S. and W. A. Siddiqui (1988). "Characterization of a Plasmodium falciparum polypeptide associated with membrane vesicles in the infected erythrocytes." Mol Biochem Parasitol **29**(2-3): 283-93.

Jahn, R., T. Lang and T. C. Sudhof (2003). "Membrane fusion." Cell **112**(4): 519-33.

Jambou, R., A. Zahraoui, B. Olofsson, A. Tavitian and G. Jaureguiberry (1996). "Small GTP-binding proteins in Plasmodium falciparum." Biol Cell **88**(3): 113-21.

Jenkins, R. E. and M. J. Tanner (1977). "Ionic-strength-dependent changes in the structure of the major protein of the human erythrocyte membrane." Biochem J **161**(1): 131-8.

Jiang, Y., A. Scarpa, L. Zhang, S. Stone, E. Feliciano and S. Ferro-Novick (1998). "A high copy suppressor screen reveals genetic interactions between BET3 and a new gene. Evidence for a novel complex in ER-to-Golgi transport." Genetics **149**(2): 833-41.

Johnson, D., K. Gunther, I. Ansorge, J. Benting, A. Kent, L. Bannister, R. Ridley and K. Lingelbach (1994). "Characterization of membrane proteins exported from Plasmodium falciparum into the host erythrocyte." Parasitology **109**(Pt 1): 1-9.

Johnstone, R. M., A. Mathew, A. B. Mason and K. Teng (1991). "Exosome formation during maturation of mammalian and avian reticulocytes: evidence that exosome release is a major route for externalization of obsolete membrane proteins." J Cell Physiol **147**(1): 27-36.

Kaneko, O., T. Tsuboi, I. T. Ling, S. Howell, M. Shirano, M. Tachibana, Y. M. Cao, A. A. Holder and M. Torii (2001). "The high molecular mass rhoptry protein, RhopH1, is

encoded by members of the clag multigene family in Plasmodium falciparum and Plasmodium yoelii." Mol Biochem Parasitol **118**(2): 223-31.

Kara, U., B. Murray, C. Pam, J. Lahnstein, H. Gould, C. Kidson and A. Saul (1990). "Chemical characterization of the parasitophorous vacuole membrane antigen QF 116 from Plasmodium falciparum." Mol Biochem Parasitol **38**(1): 19-23.

Kaviratne, M., S. M. Khan, W. Jarra and P. R. Preiser (2002). "Small variant STEVOR antigen is uniquely located within Maurer's clefts in Plasmodium falciparum-infected red blood cells." Eukaryot Cell **1**(6): 926-35.

Keller, P. and K. Simons (1997). "Post-Golgi biosynthetic trafficking." J Cell Sci **110**(Pt 24): 3001-9.

Keller, P., D. Toomre, E. Diaz, J. White and K. Simons (2001). "Multicolour imaging of post-Golgi sorting and trafficking in live cells." Nat Cell Biol **3**(2): 140-9.

Kidd, D., Y. Liu and B. F. Cravatt (2001). "Profiling serine hydrolase activities in complex proteomes." Biochemistry **40**(13): 4005-15.

Kirk, K. (2001). "Membrane transport in the malaria-infected erythrocyte." Physiol Rev **81**(2): 495-537.

Kirk, K., H. A. Horner, B. C. Elford, J. C. Ellory and C. I. Newbold (1994). "Transport of diverse substrates into malaria-infected erythrocytes via a pathway showing functional characteristics of a chloride channel." J Biol Chem **269**(5): 3339-47.

Kocken, C. H., A. M. van der Wel, M. A. Dubbeld, D. L. Narum, F. M. van de Rijke, G. J. van Gemert, X. van der Linde, L. H. Bannister, C. Janse, A. P. Waters and A. W. Thomas (1998). "Precise timing of expression of a Plasmodium falciparum-derived transgene in Plasmodium berghei is a critical determinant of subsequent subcellular localization." J Biol Chem **273**(24): 15119-24.

Kriek, N., L. Tilley, P. Horrocks, R. Pinches, B. C. Elford, D. J. Ferguson, K. Lingelbach and C. I. Newbold (2003). "Characterization of the pathway for transport of the cytoadherence-mediating protein, PfEMP1, to the host cell surface in malaria parasite-infected erythrocytes." Mol Microbiol **50**(4): 1215-1227.

Krishnegowda, G., A. M. Hajjar, J. Zhu, E. J. Douglass, S. Uematsu, S. Akira, A. S. Woods and D. C. Gowda (2004). "Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols (GPIs) of Plasmodium falciparum: Cell signaling receptors, GPI structural requirement, and regulation of GPI activity." J Biol Chem **28**: 28.

Kumar, N. and H. Zheng (1992). "Nucleotide sequence of a Plasmodium falciparum stress protein with similarity to mammalian 78-kDa glucose-regulated protein." Mol Biochem Parasitol **56**(2): 353-6.

Kumar, R., B. Adams, A. Oldenburg, A. Musiyenko and S. Barik (2002). "Characterisation and expression of a PP1 serine/threonine protein phosphatase (PfPP1) from the malaria parasite, Plasmodium falciparum: demonstration of its essential role using RNA interference." Malar J **1**(1): 5.

Kun, J. F., A. R. Hibbs, A. Saul, D. J. McColl, R. L. Coppel and R. F. Anders (1997). "A putative Plasmodium falciparum exported serine/threonine protein kinase." Mol Biochem Parasitol **85**(1): 41-51.

L. L. M. van Deenen, L. L. (1975). The Red Blood cell. G. S. Ed., Academic Press, New York**:** 147-211.

La Greca, N., A. R. Hibbs, C. Riffkin, M. Foley and L. Tilley (1997). "Identification of an endoplasmic reticulum-resident calcium-binding protein with multiple EF-hand motifs in asexual stages of Plasmodium falciparum." Mol Biochem Parasitol **89**(2): 283-93.

Ladinsky, M. S., J. R. Kremer, P. S. Furcinitti, J. R. McIntosh and K. E. Howell (1994). "HVEM tomography of the trans-Golgi network: structural insights and identification of a lace-like vesicle coat." J Cell Biol **127**(1): 29-38.

Langreth, S. G., J. B. Jensen, R. T. Reese and W. Trager (1978). "Fine structure of human malaria in vitro." J Protozool **25**(4): 443-52.

Langsley, G. and D. Chakrabarti (1996). "Plasmodium falciparum: the small GTPase rab11." Exp Parasitol **83**(2): 250-1.

Lasonder, E., Y. Ishihama, J. S. Andersen, A. M. Vermunt, A. Pain, R. W. Sauerwein, W. M. Eling, N. Hall, A. P. Waters, H. G. Stunnenberg and M. Mann (2002). "Analysis of the Plasmodium falciparum proteome by high-accuracy mass spectrometry." Nature **419**(6906): 537-42.

Lauer, S., J. VanWye, T. Harrison, H. McManus, B. U. Samuel, N. L. Hiller, N. Mohandas and K. Haldar (2000). "Vacuolar uptake of host components, and a role for cholesterol and sphingomyelin in malarial infection." Embo J **19**(14): 3556-64.

Lauer, S. A., N. Ghori and K. Haldar (1995). "Sphingolipid synthesis as a target for chemotherapy against malaria parasites." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(20): 9181-5.

Lauer, S. A., P. K. Rathod, N. Ghori and K. Haldar (1997). "A membrane network for nutrient import in red cells infected with the malaria parasite." Science **276**(5315): 1122-5.

Le Bonniec, S., C. Deregnaucourt, V. Redeker, R. Banerjee, P. Grellier, D. E. Goldberg and J. Schrevel (1999). "Plasmepsin II, an acidic hemoglobinase from the Plasmodium falciparum food vacuole, is active at neutral pH on the host erythrocyte membrane skeleton." J Biol Chem **274**(20): 14218-23.

Le Cabec, V., J. B. Cowland, J. Calafat and N. Borregaard (1996). "Targeting of proteins to granule subsets is determined by timing and not by sorting: The specific granule protein NGAL is localized to azurophil granules when expressed in HL-60 cells." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(13): 6454-7.

Le Roch, K. G., Y. Zhou, P. L. Blair, M. Grainger, J. K. Moch, J. D. Haynes, P. De La Vega, A. A. Holder, S. Batalov, D. J. Carucci and E. A. Winzeler (2003). "Discovery of Gene Function by Expression Profiling of the Malaria Parasite Life Cycle." Science **31**: 31.

Lee, P. A., E. A. Miller, J. Goldberg, L. Orci and R. Schekman (2004). "Bi-directional protein transport between the ER and Golgi." Annu Rev Cell Dev Biol **20**: 87-123.

Ling, I. T., L. Florens, A. R. Dluzewski, O. Kaneko, M. Grainger, B. Y. Yim Lim, T. Tsuboi, J. M. Hopkins, J. R. Johnson, M. Torii, L. H. Bannister, J. R. Yates, 3rd, A. A. Holder and D. Mattei (2004). "The Plasmodium falciparum clag9 gene encodes a rhoptry protein that is transferred to the host erythrocyte upon invasion." Mol Microbiol **52**(1): 107-18.

Ling, I. T., O. Kaneko, D. L. Narum, T. Tsuboi, S. Howell, H. M. Taylor, T. J. Scott-Finnigan, M. Torii and A. A. Holder (2003). "Characterisation of the rhoph2 gene of Plasmodium falciparum and Plasmodium yoelii." Mol Biochem Parasitol **127**(1): 47-57.

Lingelbach, K. R. (1993). "Plasmodium falciparum: a molecular view of protein transport from the parasite into the host erythrocyte." Exp Parasitol **76**(3): 318-27.

Lippincott-Schwartz, J., T. H. Roberts and K. Hirschberg (2000). "Secretory protein trafficking and organelle dynamics in living cells." Annu Rev Cell Dev Biol **16**: 557-89.

Liu, J., I. Y. Gluzman, M. E. Drew and D. E. Goldberg (2005). "The role of Plasmodium falciparum food vacuole plasmepsins." J Biol Chem **280**(2): 1432-7. Epub 2004 Oct 28.

Liu, Y., M. P. Patricelli and B. F. Cravatt (1999). "Activity-based protein profiling: the serine hydrolases." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(26): 14694-9.

Lopez-Estrano, C., S. Bhattacharjee, T. Harrison and K. Haldar (2003). "Cooperative domains define a unique host cell-targeting signal in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(21): 12402-7.

Luke, T. C. and S. L. Hoffman (2003). "Rationale and plans for developing a non-replicating, metabolically active, radiation-attenuated Plasmodium falciparum sporozoite vaccine." J Exp Biol **206**(Pt 21): 3803-8.

Lustigman, S., R. F. Anders, G. V. Brown and R. L. Coppel (1988). "A component of an antigenic rhoptry complex of Plasmodium falciparum is modified after merozoite invasion." Mol Biochem Parasitol **30**(3): 217-24.

Lyon, J. A. and J. D. Haynes (1986). "Plasmodium falciparum antigens synthesized by schizonts and stabilized at the merozoite surface when schizonts mature in the presence of protease inhibitors." J Immunol **136**(6): 2245-51.

MacPherson, G. G., M. J. Warrell, N. J. White, S. Looareesuwan and D. A. Warrell (1985). "Human cerebral malaria. A quantitative ultrastructural analysis of parasitized erythrocyte sequestration." Am J Pathol **119**(3): 385-401.

Mahanty, S., A. Saul and L. H. Miller (2003). "Progress in the development of recombinant and synthetic blood-stage malaria vaccines." J Exp Biol **206**(Pt 21): 3781-8.

Malaney, P., A. Spielman and J. Sachs (2004). "The malaria gap." Am J Trop Med Hyg **71**(2 Suppl): 141-6.

Marti, M., R. T. Good, M. Rug, E. Knuepfer and A. F. Cowman (2004). "Targeting malaria virulence and remodeling proteins to the host erythrocyte." Science **306**(5703): 1930-3.

Martinez, S. L., C. A. Clavijo and E. Winograd (1998). "Identification of peripheral membrane proteins associated with the tubo-vesicular network of Plasmodium falciparum infected erythrocytes." Mol Biochem Parasitol **91**(2): 273-80.

Martoglio, B. and B. Dobberstein (1998). "Signal sequences: more than just greasy peptides." Trends Cell Biol **8**(10): 410-5.

Maurer, G. (1900). "Die Tüpfelung der Wirtszelle des Tertianaparasiten." Centralbl f Bakt Abt I **28**: 114-125.

Mayer, H., H. Bauer, J. Breuss, S. Ziegler and R. Prohaska (2001). "Characterization of rat LANCL1, a novel member of the lanthionine synthetase C-like protein family, highly expressed in testis and brain." Gene **269**(1-2): 73-80.

Mayer, H., J. Breuss, S. Ziegler and R. Prohaska (1998). "Molecular characterization and tissue-specific expression of a murine putative G-protein-coupled receptor." Biochim Biophys Acta **1399**(1): 51-6.

Mayer, H., M. Pongratz and R. Prohaska (2001). "Molecular cloning, characterization, and tissue-specific expression of human LANCL2, a novel member of the LanC-like protein family." DNA Seq **12**(3): 161-6.

McFadden, G. I., M. E. Reith, J. Munholland and N. Lang-Unnasch (1996). "Plastid in human parasites." Nature **381**(6582): 482.

Mellman, I., E. Yamamoto, J. A. Whitney, M. Kim, W. Hunziker and K. Matter (1993). "Molecular sorting in polarized and non-polarized cells: common problems, common solutions." J Cell Sci Suppl **17**: 1-7.

Miller, S. K., R. T. Good, D. R. Drew, M. Delorenzi, P. R. Sanders, A. N. Hodder, T. P. Speed, A. F. Cowman, T. F. de Koning-Ward and B. S. Crabb (2002). "A subset of Plasmodium falciparum SERA genes are expressed and appear to play an important role in the erythrocytic cycle." J Biol Chem **277**(49): 47524-32.

Morrow, I. C., S. Rea, S. Martin, I. A. Prior, R. Prohaska, J. F. Hancock, D. E. James and R. G. Parton (2002). "Flotillin-1/reggie-2 traffics to surface raft domains via a novel golgi-independent pathway. Identification of a novel membrane targeting domain and a role for palmitoylation." J Biol Chem **277**(50): 48834-41. Epub 2002 Oct 04.

Moskes, C., P. A. Burghaus, B. Wernli, U. Sauder, M. Durrenberger and B. Kappes (2004). "Export of Plasmodium falciparum calcium-dependent protein kinase 1 to the parasitophorous vacuole is dependent on three N-terminal membrane anchor motifs." Mol Microbiol **54**(3): 676-91.

Murphy, S. C., B. U. Samuel, T. Harrison, K. D. Speicher, D. W. Speicher, M. E. Reid, R. Prohaska, P. S. Low, M. J. Tanner, N. Mohandas and K. Haldar (2003). "Erythrocyte detergent-resistant membrane proteins: their characterization and selective uptake during malarial infection." Blood **30**: 30.

Nacer, A., L. Berry, C. Slomianny and D. Mattei (2001). "Plasmodium falciparum signal sequences: simply sequences or special signals?" Int J Parasitol **31**(12): 1371-9.

Nelson, W. J. and C. Yeaman (2001). "Protein trafficking in the exocytic pathway of polarized epithelial cells." Trends Cell Biol **11**(12): 483-6.

Ngo, H. M., M. Yang and K. A. Joiner (2004). "Are rhoptries in Apicomplexan parasites secretory granules or secretory lysosomal granules?" Mol Microbiol **52**(6): 1531-41.

Nilsson, T., M. H. Hoe, P. Slusarewicz, C. Rabouille, R. Watson, F. Hunte, G. Watzele, E. G. Berger and G. Warren (1994). "Kin recognition between medial Golgi enzymes in HeLa cells." Embo J **13**(3): 562-74.

Nirmala, X. and A. A. James (2003). "Engineering Plasmodium-refractory phenotypes in mosquitoes." Trends Parasitol **19**(9): 384-7.

Ogun, S. A. and A. A. Holder (1996). "A high molecular mass Plasmodium yoelii rhoptry protein binds to erythrocytes." Mol Biochem Parasitol **76**(1-2): 321-4.

Olliaro, P. and F. Castelli (1997). "Plasmodium falciparum: an electronmicroscopy study of caveolae and trafficking between the parasite and the extracellular medium." Int J Parasitol **27**(9): 1007-12.

Papakrivos, J., C. I. Newbold and K. Lingelbach (2005). "A potential novel mechanism for the insertion of a membrane protein revealed by a biochemical analysis of the Plasmodium falciparum cytoadherence molecule PfEMP-1." Mol Microbiol **55**(4): 1272-84.

Pelkmans, L. and A. Helenius (2002). "Endocytosis via caveolae." Traffic **3**(5): 311-20.

Przyborski, J. M., H. Wickert, G. Krohne and M. Lanzer (2003). "Maurer's clefts--a novel secretory organelle?" Mol Biochem Parasitol **132**(1): 17-26.

Quevillon, E., T. Spielmann, K. Brahimi, D. Chattopadhyay, E. Yeramian and G. Langsley (2003). "The Plasmodium falciparum family of Rab GTPases." Gene **306**: 13-25.

Ragge, K., H. H. Arnold, M. Tummler, B. Knapp, E. Hundt and K. Lingelbach (1990). "In vitro biosynthesis and membrane translocation of the serine rich protein of Plasmodium falciparum." Mol Biochem Parasitol **42**(1): 93-100.

Rapoport, I., Y. C. Chen, P. Cupers, S. E. Shoelson and T. Kirchhausen (1998). "Dileucine-based sorting signals bind to the beta chain of AP-1 at a site distinct and regulated differently from the tyrosine-based motif-binding site." Embo J **17**(8): 2148-55.

Resh, M. D. (1999). "Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins." Biochim Biophys Acta **1451**(1): 1-16.

Roberg, K. J., N. Rowley and C. A. Kaiser (1997). "Physiological regulation of membrane protein sorting late in the secretory pathway of Saccharomyces cerevisiae." J Cell Biol **137**(7): 1469-82.

Roggwiller, E., M. E. Betoulle, T. Blisnick and C. Braun Breton (1996). "A role for erythrocyte band 3 degradation by the parasite gp76 serine protease in the formation of

the parasitophorous vacuole during invasion of erythrocytes by Plasmodium falciparum." Mol Biochem Parasitol **82**(1): 13-24.

Roggwiller, E., T. Blisnick and C. Braun Breton (1998). "A Plasmodium falciparum hemolytic activity." Mol Biochem Parasitol **94**(2): 303-7.

Roggwiller, E., A. C. Fricaud, T. Blisnick and C. Braun-Breton (1997). "Host urokinase-type plasminogen activator participates in the release of malaria merozoites from infected erythrocytes." Mol Biochem Parasitol **86**(1): 49-59.

Rosenthal, P. J. (2004). "Cysteine proteases of malaria parasites." Int J Parasitol **34**(13-14): 1489-99.

Rosenthal, P. J., P. S. Sijwali, A. Singh and B. R. Shenai (2002). "Cysteine proteases of malaria parasites: targets for chemotherapy." Curr Pharm Des **8**(18): 1659-72.

Rug, M., M. E. Wickham, M. Foley, A. F. Cowman and L. Tilley (2004). "Correct promoter control is needed for trafficking of the ring-infected erythrocyte surface antigen to the host cytosol in transfected malaria parasites." Infect Immun **72**(10): 6095-105.

Sahl, H. G. and G. Bierbaum (1998). "Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from gram-positive bacteria." Annu Rev Microbiol **52**: 41-79.

Salmon, B. L., A. Oksman and D. E. Goldberg (2001). "Malaria parasite exit from the host erythrocyte: a two-step process requiring extraerythrocytic proteolysis." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(1): 271-6.

Sam-Yellowe, T. Y., L. Florens, J. R. Johnson, T. Wang, J. A. Drazba, K. G. Le Roch, Y. Zhou, S. Batalov, D. J. Carucci, E. A. Winzeler and J. R. Yates, 3rd (2004). "A Plasmodium Gene Family Encoding Maurer's Cleft Membrane Proteins: Structural Properties and Expression Profiling." Genome Res **12**: 12.

Sam-Yellowe, T. Y., L. Florens, T. Wang, J. D. Raine, D. J. Carucci, R. Sinden and J. R. Yates, 3rd (2004). "Proteome analysis of rhoptry-enriched fractions isolated from Plasmodium merozoites." J Proteome Res **3**(5): 995-1001.

Sam-Yellowe, T. Y., H. Fujioka, M. Aikawa, T. Hall and J. A. Drazba (2001). "A Plasmodium falciparum protein located in Maurer's clefts underneath knobs and protein localization in association with Rhop-3 and SERA in the intracellular network of infected erythrocytes." Parasitol Res **87**(3): 173-85.

Sam-Yellowe, T. Y. and M. E. Perkins (1991). "Interaction of the 140/130/110 kDa rhoptry protein complex of Plasmodium falciparum with the erythrocyte membrane and liposomes." Exp Parasitol **73**(2): 161-71.

Sam-Yellowe, T. Y., H. Shio and M. E. Perkins (1988). "Secretion of Plasmodium falciparum rhoptry protein into the plasma membrane of host erythrocytes." J Cell Biol **106**(5): 1507-13.

Samuel, B. U., N. Mohandas, T. Harrison, H. McManus, W. Rosse, M. Reid and K. Haldar (2001). "The role of cholesterol and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins of erythrocyte rafts in regulating raft protein content and malarial infection." J Biol Chem **276**(31): 29319-29. Epub 2001 May 14.

Scherf, A., B. Pouvelle, P. A. Buffet and J. Gysin (2001). "Molecular mechanisms of Plasmodium falciparum placental adhesion." Cell Microbiol **3**(3): 125-31.

Schofield, L., S. Novakovic, P. Gerold, R. T. Schwarz, M. J. McConville and S. D. Tachado (1996). "Glycosylphosphatidylinositol toxin of Plasmodium up-regulates intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and E-selectin expression in vascular endothelial cells and increases leukocyte and parasite cytoadherence via tyrosine kinase-dependent signal transduction." J Immunol **156**(5): 1886-96.

Schofield, L., L. Vivas, F. Hackett, P. Gerold, R. T. Schwarz and S. Tachado (1993). "Neutralizing monoclonal antibodies to glycosylphosphatidylinositol, the dominant

TNF-alpha-inducing toxin of Plasmodium falciparum: prospects for the immunotherapy of severe malaria." Ann Trop Med Parasitol **87**(6): 617-26.

Schwarze, S. R., K. A. Hruska and S. F. Dowdy (2000). "Protein transduction: unrestricted delivery into all cells?" Trends Cell Biol **10**(7): 290-5.

Shahabuddin, M., K. Gunther, K. Lingelbach, M. Aikawa, M. Schreiber, R. G. Ridley and J. G. Scaife (1992). "Localisation of hypoxanthine phosphoribosyl transferase in the malaria parasite Plasmodium falciparum." Exp Parasitol **74**(1): 11-9.

Simons, K. and E. Ikonen (1997). "Functional rafts in cell membranes." Nature **387**(6633): 569-72.

Sinden, R. E., E. U. Canning, R. S. Bray and M. E. Smalley (1978). "Gametocyte and gamete development in Plasmodium falciparum." Proc R Soc Lond B Biol Sci **201**(1145): 375-99.

Singh, B., L. Kim Sung, A. Matusop, A. Radhakrishnan, S. S. Shamsul, J. Cox-Singh, A. Thomas and D. J. Conway (2004). "A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings." Lancet **363**(9414): 1017-24.

Sijwali, P. S. and P. J. Rosenthal (2004). "Gene disruption confirms a critical role for the cysteine protease falcipain-2 in hemoglobin hydrolysis by Plasmodium falciparum." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(13): 4384-9. Epub 2004 Mar 15.

Slater, A. F. and A. Cerami (1992). "Inhibition by chloroquine of a novel haem polymerase enzyme activity in malaria trophozoites." Nature **355**(6356): 167-9.

Slomianny, C. and G. Prensier (1990). "A cytochemical ultrastructural study of the lysosomal system of different species of malaria parasites." J Protozool **37**(6): 465-70.

Spielmann, T., D. J. Fergusen and H. P. Beck (2003). "etramps, a new Plasmodium falciparum gene family coding for developmentally regulated and highly charged membrane proteins located at the parasite-host cell interface." Mol Biol Cell **14**(4): 1529-44.

Spycher, C., N. Klonis, T. Spielmann, E. Kump, S. Steiger, L. Tilley and H. P. Beck (2003). "MAHRP-1, a novel Plasmodium falciparum histidine-rich protein, binds ferriprotoporphyrin IX and localises to the Maurer's clefts." J Biol Chem **18**: 18.

Stafford, W. H., R. W. Stockley, S. B. Ludbrook and A. A. Holder (1996). "Isolation, expression and characterization of the gene for an ADP-ribosylation factor from the human malaria parasite, Plasmodium falciparum." Eur J Biochem **242**(1): 104-13.

Struik, S. S. and E. M. Riley (2004). "Does malaria suffer from lack of memory?" Immunol Rev **201**: 268-90.

Sutton, R. B., D. Fasshauer, R. Jahn and A. T. Brunger (1998). "Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 A resolution." Nature **395**(6700): 347-53.

Tabe, L., P. Krieg, R. Strachan, D. Jackson, E. Wallis and A. Colman (1984). "Segregation of mutant ovalbumins and ovalbumin-globin fusion proteins in Xenopus oocytes. Identification of an ovalbumin signal sequence." J Mol Biol **180**(3): 645-66.

Tachado, S. D., P. Gerold, M. J. McConville, T. Baldwin, D. Quilici, R. T. Schwarz and L. Schofield (1996). "Glycosylphosphatidylinositol toxin of Plasmodium induces nitric oxide synthase expression in macrophages and vascular endothelial cells by a protein tyrosine kinase-dependent and protein kinase C-dependent signaling pathway." J Immunol **156**(5): 1897-1907.

Taraschi, T. F., M. O'Donnell, S. Martinez, T. Schneider, D. Trelka, V. M. Fowler, L. Tilley and Y. Moriyama (2003). "Generation of an erythrocyte vesicle transport system by Plasmodium falciparum malaria parasites." Blood **17**: 17.

Taylor, D. W., M. Parra, G. B. Chapman, M. E. Stearns, J. Rener, M. Aikawa, S. Uni, S. B. Aley, L. J. Panton and R. J. Howard (1987). "Localization of Plasmodium falciparum

histidine-rich protein 1 in the erythrocyte skeleton under knobs." Mol Biochem Parasitol **25**(2): 165-74.
Thiele, C., H. H. Gerdes and W. B. Huttner (1997). "Protein secretion: puzzling receptors." Curr Biol **7**(8): R496-500.
Tongren, J. E., F. Zavala, D. S. Roos and E. M. Riley (2004). "Malaria vaccines: if at first you don't succeed." Trends Parasitol **20**(12): 604-10.
Trager, W., M. A. Rudzinska and P. C. Bradbury (1966). "The fine structure of Plasmodium falciparum and its host erythrocytes in natural malarial infections in man." Bull World Health Organ **35**(6): 883-5.
Trelka, D. P., T. G. Schneider, J. C. Reeder and T. F. Taraschi (2000). "Evidence for vesicle-mediated trafficking of parasite proteins to the host cell cytosol and erythrocyte surface membrane in Plasmodium falciparum infected erythrocytes." Mol Biochem Parasitol **106**(1): 131-45.
Trenholme, K. R., D. L. Gardiner, D. C. Holt, E. A. Thomas, A. F. Cowman and D. J. Kemp (2000). "clag9: A cytoadherence gene in Plasmodium falciparum essential for binding of parasitized erythrocytes to CD36." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(8): 4029-33.
Valderrama, F., A. Luna, T. Babia, J. A. Martinez-Menarguez, J. Ballesta, H. Barth, C. Chaponnier, J. Renau-Piqueras and G. Egea (2000). "The golgi-associated COPI-coated buds and vesicles contain beta/gamma -actin." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(4): 1560-5.
van Vliet, C., E. C. Thomas, A. Merino-Trigo, R. D. Teasdale and P. A. Gleeson (2003). "Intracellular sorting and transport of proteins." Prog Biophys Mol Biol **83**(1): 1-45.
Van Wye, J., N. Ghori, P. Webster, R. R. Mitschler, H. G. Elmendorf and K. Haldar (1996). "Identification and localization of rab6, separation of rab6 from ERD2 and implications for an 'unstacked' Golgi, in Plasmodium falciparum." Mol Biochem Parasitol **83**(1): 107-20.
von Heijne, G. (1985). "Signal sequences. The limits of variation." J Mol Biol **184**(1): 99-105.
Waller, R. F., M. B. Reed, A. F. Cowman and G. I. McFadden (2000). "Protein trafficking to the plastid of Plasmodium falciparum is via the secretory pathway." Embo J **19**(8): 1794-802.
Wang, L., N. Mohandas, A. Thomas and R. L. Coppel (2003). "Detection of detergent-resistant membranes in asexual blood-stage parasites of Plasmodium falciparum." Mol Biochem Parasitol **130**(2): 149-53.
Ward, G. E., L. H. Miller and J. A. Dvorak (1993). "The origin of parasitophorous vacuole membrane lipids in malaria-infected erythrocytes." J Cell Sci **106**(Pt 1): 237-48.
Ward, G. E., L. G. Tilney and G. Langsley (1997). "Rab GTPases and the unusual secretory pathway of plasmodium." Parasitol Today **13**(2): 63-9.
Ward, P., L. Equinet, J. Packer and C. Doerig (2004). "Protein kinases of the human malaria parasite Plasmodium falciparum: the kinome of a divergent eukaryote." BMC Genomics **5**(1): 79.
Washburn, M. P., D. Wolters and J. R. Yates, 3rd (2001). "Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology." Nat Biotechnol **19**(3): 242-7.
Waterkeyn, J. G., M. E. Wickham, K. M. Davern, B. M. Cooke, R. L. Coppel, J. C. Reeder, J. G. Culvenor, R. F. Waller and A. F. Cowman (2000). "Targeted mutagenesis of Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 3 (PfEMP3) disrupts cytoadherence of malaria-infected red blood cells." Embo J **19**(12): 2813-23.
Wengelnik, K., V. Vidal, M. L. Ancelin, A. M. Cathiard, J. L. Morgat, C. H. Kocken, M. Calas, S. Herrera, A. W. Thomas and H. J. Vial (2002). "A class of potent

antimalarials and their specific accumulation in infected erythrocytes." Science **295**(5558): 1311-4.

White, N. J., F. Nosten, S. Looareesuwan, W. M. Watkins, K. Marsh, R. W. Snow, G. Kokwaro, J. Ouma, T. T. Hien, M. E. Molyneux, T. E. Taylor, C. I. Newbold, T. K. Ruebush, 2nd, M. Danis, B. M. Greenwood, R. M. Anderson and P. Olliaro (1999). "Averting a malaria disaster." Lancet **353**(9168): 1965-7.

Wickert, H., P. Rohrbach, S. J. Scherer, G. Krohne and M. Lanzer (2003). "A putative Sec23 homologue of Plasmodium falciparum is located in Maurer's clefts." Mol Biochem Parasitol **129**(2): 209-13.

Wickert, H., F. Wissing, K. T. Andrews, A. Stich, G. Krohne and M. Lanzer (2003). "Evidence for trafficking of PfEMP1 to the surface of P. falciparum-infected erythrocytes via a complex membrane network." Eur J Cell Biol **82**(6): 271-84.

Wickham, M. E., J. G. Culvenor and A. F. Cowman (2003). "Selective inhibition of a two-step egress of malaria parasites from the host erythrocyte." J Biol Chem **278**(39): 37658-63. Epub 2003 Jul 11.

Wickham, M. E., M. Rug, S. A. Ralph, N. Klonis, G. I. McFadden, L. Tilley and A. F. Cowman (2001). "Trafficking and assembly of the cytoadherence complex in Plasmodium falciparum-infected human erythrocytes." Embo J **20**(20): 5636-5649.

Wiser, M. F., H. N. Lanners, R. A. Bafford and J. M. Favaloro (1997). "A novel alternate secretory pathway for the export of Plasmodium proteins into the host erythrocyte." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(17): 9108-13.

Wu, Y., X. Wang, X. Liu and Y. Wang (2003). "Data-mining approaches reveal hidden families of proteases in the genome of malaria parasite." Genome Res **13**(4): 601-16.

Yang, S., D. Nikodem, E. A. Davidson and D. C. Gowda (1999). "Glycosylation and proteolytic processing of 70 kDa C-terminal recombinant polypeptides of Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 expressed in mammalian cells." Glycobiology **9**(12): 1347-56.

Yeung, S., W. Pongtavornpinyo, I. M. Hastings, A. J. Mills and N. J. White (2004). "Antimalarial drug resistance, artemisinin-based combination therapy, and the contribution of modeling to elucidating policy choices." Am J Trop Med Hyg **71**(2 Suppl): 179-86.

Yokoyama, D., A. Saito-Ito, N. Asao, K. Tanabe, M. Yamamoto and T. Matsumura (1998). "Modulation of the growth of Plasmodium falciparum in vitro by protein serine/threonine phosphatase inhibitors." Biochem Biophys Res Commun **247**(1): 18-23.

Yuthavong, Y. and T. Limpaiboon (1987). "The relationship of phosphorylation of membrane proteins with the osmotic fragility and filterability of Plasmodium berghei-infected mouse erythrocytes." Biochim Biophys Acta **929**(3): 278-87.

Résumé

Le développement érythrocytaire de *Plasmodium falciparum*, l'agent du paludisme, est responsable de tous les symptômes liés à la maladie. Les formes sanguines du parasite possèdent plusieurs organites qui se sont révélés essentiels au développement intra-érythrocytaire. Parmi ceux-ci, nous nous sommes intéressés à un compartiment tout à fait original connu sous le nom de structures de Maurer. Ce compartiment, qui présente des caractéristiques de Golgi, est localisé dans le cytoplasme de la cellule hôte et assure le transfert de protéines parasitaires à la membrane érythrocytaire. Les structures de Maurer participent notamment au transport des protéines parasitaires liées au phénomène de cytoadhérence, qui est à l'origine du neuropaludisme. Notre travail a de plus permis de montrer leur rôle dans la libération des mérozoïtes infectieux.

Nous avons entrepris une étude protéomique et fonctionnelle de ce compartiment afin de mieux comprendre son rôle biologique et d'identifier des enzymes essentielles au parasite, qui pourraient être validées comme cibles chimio-thérapeutiques. Nos études ont identifié dans ces structures la protéine RhopH2 qui semble présenter une activité sérine protéase dont nous poursuivons la caractérisation. Nous avons également, par une approche protéomique globale, identifié près de 50 protéines parasitaires dans des préparations de fantômes de globules rouges parasités, qui contiennent la membrane plasmique et le squelette sous-membranaire érythrocytaire ainsi que les structures de Maurer. Cette étude, ainsi que la caractérisation de l'interaction entre PfSBP1, protéine intégrale de la membrane des structures de Maurer, et LANCL1, protéine du squelette sous membranaire érythrocytaire, permettent de préciser les modalités d'interaction entre structures de Maurer et membrane plasmique de la cellule hôte du parasite. À terme, notre analyse devrait permettre de mieux comprendre le rôle biologique des structures de Maurer ainsi que les voies d'adressage des protéines parasitaires à ce compartiment extracellulaire tout à fait original.

Mots clé : paludisme, structures de Maurer, compartiment sécrétoire, transport intracellulaire, protéomique, protéases, posphatases